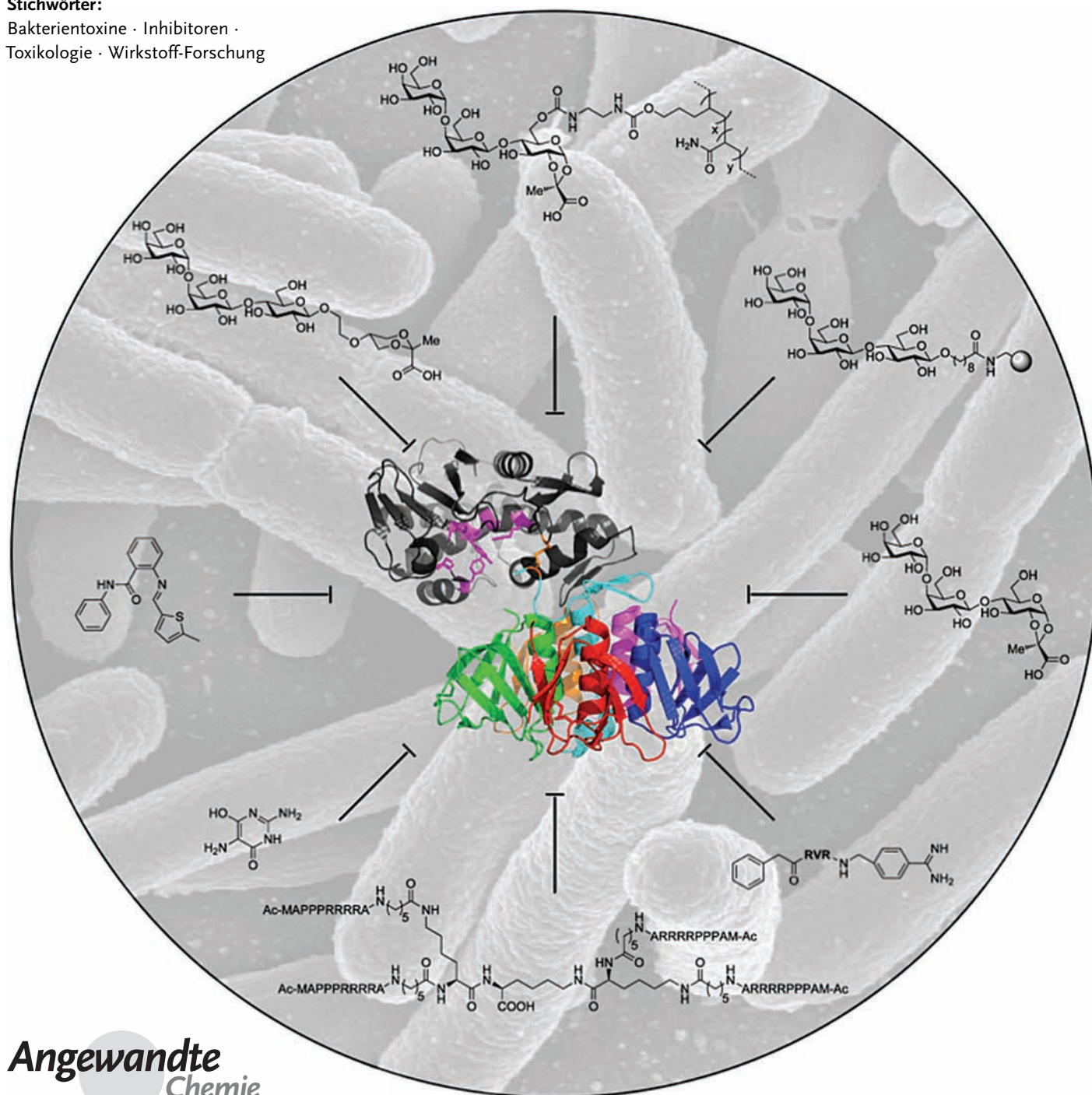


Therapien gegen Bakterientoxine

Mattias E. Ivarsson, Jean-Christophe Leroux und Bastien Castagner*

Stichwörter:

Bakterientoxine · Inhibitoren ·
Toxikologie · Wirkstoff-Forschung



Proteintoxine sind die hauptsächlichen Virulenzfaktoren einiger Bakterienarten und haben sich in der Wirkstoff-Entwicklung als vielversprechende Zielstrukturen erwiesen. Leitsubstanzen, die auf Bakterientoxine abzielen, variieren von niedermolekularen Verbindungen zu polymeren Bindungsstoffen, und sie greifen beim Mechanismus der Toxin-vermittelten Pathogenität in jeden der vielen Schritte ein. Auch wenn in diesem Bereich in letzter Zeit bedeutende Fortschritte erzielt wurden, hat es bisher noch kein rational entwickelter Wirkstoff gegen Toxine zur Marktreife gebracht. Dieser Aufsatz bietet einen Überblick über den Stand der Forschung bei der Entwicklung von Wirkstoffen gegen Bakterientoxine, mit kritischer Beleuchtung der erzielten Durchbrüche wie auch der noch zu nehmenden Hürden. Die Diskussion konzentriert sich auf Proteintoxine vom A-B-Typ, die von vier Bakterienarten sezerniert werden, nämlich *Clostridium difficile* (Toxine A und B), *Vibrio cholerae* (Cholera-Toxin), enterohämorrhagische *Escherichia coli* (Shiga-Toxin) und *Bacillus anthracis* (Anthrax-Toxin). Dies sind die Krankheitserreger, für die Therapien zu verbessern sind.

1. Einleitung

Proteintoxine bilden einen wesentlichen Bestandteil der Virulenzfaktoren, die die gesundheitsschädlichen Folgen pathogener Bakterien vermitteln. Seit der Entdeckung des Diphtherie-Toxins im Jahr 1888 wurden über 300 Bakterientoxine identifiziert, und viele von ihnen sind derzeit als Auslöser zahlreicher bakterieller Erkrankungen anerkannt.^[1] Dazu gehören bekannte Krankheiten wie Cholera und Milzbrand sowie neu auftretende Bedrohungen wie Infektionen mit *Clostridium difficile* (CDI).

Antibiotika sind noch immer die bevorzugte Behandlungsmethode bakterieller Erkrankungen. Allerdings bieten Therapien gegen Virulenzfaktoren einige Vorteile gegenüber solchen, die auf die Bakterien selbst abzielen.^[2] Erstens üben diese Therapien weniger evolutionären Druck auf Bakterien aus und führen daher mit geringerer Wahrscheinlichkeit zum Auftauchen resistenter Stämme – einem Problem, das als eine der größten Herausforderungen des 21. Jahrhunderts gilt.^[3] Zweitens können Toxine fortlaufend Symptome hervorrufen, sogar nachdem die Bakterien aus dem Wirt entfernt wurden.^[4] Drittens vermeiden nichtantibiotische Therapien die Zerstörung der normalen Mikrobiota, wie sie normalerweise bei Antibiotikatherapien auftritt.

Bakterielle Toxine weisen erstaunlich vielfältige Wirkmechanismen auf: Sie können auf Rezeptoren der Zelloberfläche einwirken, die Plasmamembran zerstören oder enzymatisch intrazelluläre Zielstrukturen modifizieren.^[1] Der letztgenannte Typ ist als A-B-Toxin bekannt, mit der bindenden (B-)Untereinheit, die Rezeptorbindung und Toxintranslokation beeinflusst, und der aktiven (A-)Untereinheit, die eine enzymatische Domäne enthält, die die zelluläre Homöostase stört.^[5] Das detaillierte Verständnis dieser Mechanismen hat es Wissenschaftlern ermöglicht, kreative Ansätze zur Hemmung von Bakterientoxinen zu entwickeln. Die

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4099
2. Nichtantibiotische Therapieansätze	4105
3. Zusammenfassung und Ausblick	4116

Stufen des molekularen Pathogenitätsmechanismus freigesetzter A-B-Toxine sind in Abbildung 1 gezeigt. Dieser Aufsatz stellt verschiedene chemische Therapieansätze vor, die auf diese Stufen einwirken, liefert den Kontext, um sie zu verstehen, und bespricht die besonderen Schwierigkeiten bei der Umsetzung dieser Konzepte in wirksame Therapien. Der

erste Abschnitt gibt einen Überblick über die vorhandenen Kenntnisse zur Pathogenese und über aktuelle Therapien gegen Toxin-vermittelte Krankheiten, die von vier gut dokumentierten Bakterienarten hervorgerufen werden (*Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, enterohämorrhagische *Escherichia coli* und *Bacillus anthracis*). Der zweite Abschnitt beschreibt ausgewählte Behandlungsmethoden zur Hemmung der Toxinpathogenität.

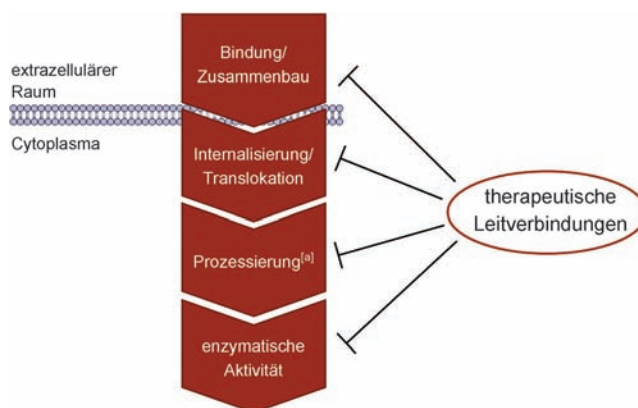


Abbildung 1. Stufen der Pathogenese von Bakterientoxinen in eukaryotischen Zellen, die mögliche Angriffspunkte für Wirkstoffe sind. Solche Moleküle umfassen polymere Bindungsstoffe, unlösliche Sorptionsmittel, Peptide, Peptidanaloga und nichtpeptidische niedermolekulare Verbindungen. [a] Die Prozessierung kann vor der Internalisierung/Translokation geschehen (z. B. Anthrax-Toxin).

[*] M. E. Ivarsson, Prof. J.-C. Leroux, Dr. B. Castagner
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, ETH Zürich
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, Zürich (Schweiz)
E-Mail: bastien.castagner@pharma.ethz.ch

1.1. *Clostridium difficile* (Toxin A und B)

CDI ist für ein Spektrum von Krankenhausinfektionen verantwortlich, von leichtem Durchfall bis zu lebensbedrohlichen Zuständen wie toxischem Megakolon, septischem Schock oder Darmdurchbruch.^[6] Die drei großen Risikofaktoren für CDI sind antibiotische Behandlung, Krankenhausaufenthalt und Alter.^[7] Eine Behandlung mit Breitbandantibiotika gegen Anaerobier verändert das Gleichgewicht von Bakterienarten im Darm. Diese Dysbiose erleichtert die Kolonisierung des Dickdarms mit *C. difficile*.^[6] In den letzten 15 Jahren erregte *C. difficile* wegen massiver Zunahme der Zahl und des Schweregrads von Infektionen in Nordamerika und Europa Aufmerksamkeit.^[8] Diese Beobachtungen wurden zu dem Ausbruch eines epidemischen, hypervirulenten Stammes von *C. difficile*, der als Toxintyp III Ribotyp 027 klassifiziert wurde, zurückverfolgt.^[9] Der erhöhte Schweregrad von *C. difficile*-assoziierten Krankheiten ist durch ein vermehrtes Auftreten von toxischem Megakolon (mehr Fälle bei jüngeren Patienten), höhere Rückfallquoten und mehr Todesfälle geprägt.^[10]

C. difficile kolonisiert den Darm, indem es Flagellen und Proteasen nutzt, um zur enterozytischen Schicht durchzustößen, an die es mithilfe von Adhäsinen bindet.^[6] Hier sondert es drei Toxine ab, die unterschiedlich zur Virulenz beitragen: Toxin A (TcdA), Toxin B (TcdB) und *C. difficile*-Transferase (CDT).^[11] CDT ist ein binäres, Actin-ADP-ribosylierendes Toxin, das in Zellen die Bildung von Mikrotubuli-Projektionen hervorruft. Seine Rolle bei der Virulenz von *C. difficile* bleibt allerdings unklar.^[12] TcdA und TcdB sind Glucosyltransferasen (GTs), die das Actin-Zytoskelett durch Glucosylierung der in menschlichen Zellen vorkommenden Rho-GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 verändern.^[13] Die Wirkung beider Toxine auf die Regulationsmaschinerie des Zytoskellts führt zur Zellrundung und schließlich zum Zelltod.^[14] TcdA und TcdB sind für die Pathogenese verantwortlich. Allerdings finden sich widersprüchliche Berichte darüber, welche Form schädlicher ist. In Infektionsmodellen ist TcdB wichtiger als TcdA, aber Stämme, die nur das zweite Toxin produzieren, können bei Hamstern immer noch zu Krankheit und Tod führen.^[15]

Die eng verwandten Toxine TcdA und TcdB können in vier funktionelle Domänen eingeteilt werden: eine C-terminale Rezeptor bindende Domäne, eine hydrophobe Translokationsdomäne, eine autoprozessierende Cysteinproteasedomäne (CPD) und eine Glucosyltransferasedomäne (Abbil-

dung 2).^[14,16] TcdA und TcdB binden Enterozyten über ihre Rezeptor bindende Domäne.^[17] TcdA bindet an Glycoprotein96 (gp96) auf der Oberfläche von menschlichen Darmepithelzellen, Details der Wechselwirkung sind allerdings noch unbekannt.^[18] TcdA bindet an unterschiedliche Glycane, z.B. an das Trisaccharid $\alpha\text{Gal}(1-3)\beta\text{Gal}(1-4)\text{GlcNAc}$, einen Zucker, der jedoch in menschlichem Gewebe nicht vorhanden ist.^[19] Die Charakterisierung des Rezeptors für TcdB ist sogar noch schwieriger, trotz der Tatsache, dass TcdB auf ein breites Spektrum von Zelltypen toxisch wirkt, was auf eine ubiquitäre Expression seines Rezeptors schließen lässt.^[14] Sind TcdA und TcdB einmal an die Zelloberfläche gebunden, werden sie durch Endozytose internalisiert

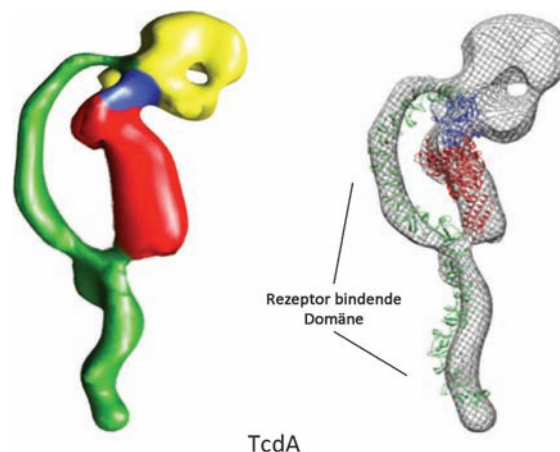


Abbildung 2. Struktur von TcdA (nachgewiesen durch Negativfärbung-Elektronenmikroskopie) mit der Glucosyltransferase- (rot), der Cystein-Protease- (blau), der Translokations- (gelb) und der Rezeptor bindenden Domäne (grün). Das rechte Bild ist eine Überlagerung des linken Bildes mit bekannten Kristallstrukturen.^[20]

(Abbildung 3). Ansäuerung des endosomalen Kompartiments bewirkt eine Konformationsänderung, die die hydrophobe Region in der Domäne, welche vermutlich die Bindungstaschen bildet, freilegt und zur Membraninsertion führt, wobei der N-Terminus in das Zytosol hineinragt und der C-Terminus im endosomalen Kompartiment verbleibt.^[16]

Myo-Inosithexakisphosphat (IP6), ein Signalmolekül, das hauptsächlich im Zytosol vom Säugetierzellen vorkommt, bindet an die CPD, nachdem sie ins Zytosol überführt worden ist, und aktiviert sie, was eine Autoprozessierung der Toxine



Bastien Castagner erhielt den BSc in Chemie von der University of Montreal (Kanada) und promovierte 2004 in organischer Synthese an der Columbia University in New York (USA). Anschließend forschte er als Postdoktorant in der Arbeitsgruppe von Prof. P. H. Seeberger an der ETH Zürich. Er ist momentan Gruppenleiter am Institut für pharmazeutische Wissenschaften an der ETH, wo sich seine Forschung auf Wirkstoff-Entdeckung und -Transport konzentriert.



Jean-Christophe Leroux leitet das Labor Drug Formulation and Delivery an der ETH Zürich. Er promovierte 1995 in pharmazeutischen Wissenschaften an der Universität Genf bei Prof. R. Gurny und verbrachte 1997 einen Postdoktoranden-Aufenthalt bei Prof. R. Siegel an der University of California, San Francisco. Bevor er 2008 zur ETH wechselte, war er Professor der pharmazeutischen Technologie an der University of Montreal.

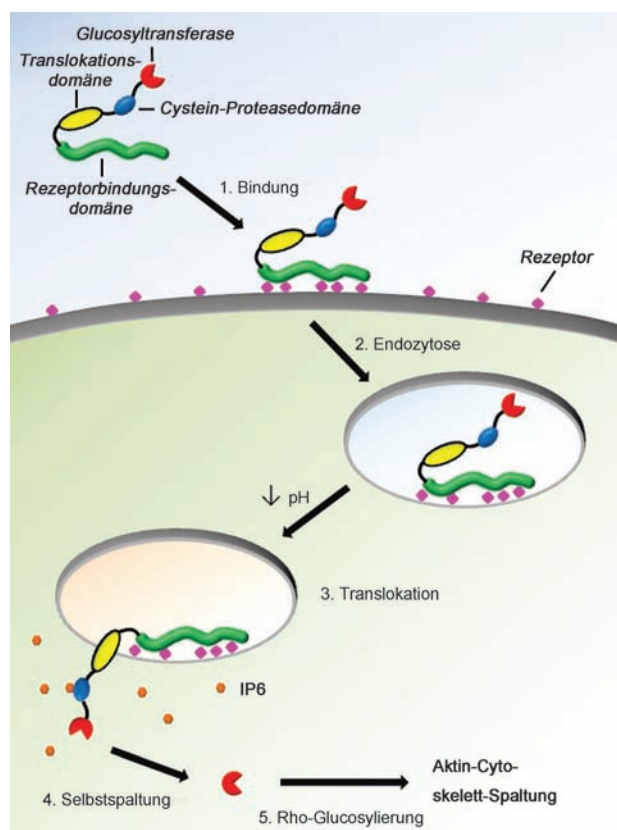


Abbildung 3. Molekularer Wirkmechanismus von TcdA und TcdB. Die Toxine binden an die Oberfläche von Enterozyten über die Rezeptor bindende Domäne und werden durch Endozytose aufgenommen. Ansäuerung des Endosoms bewirkt eine Überführung der enzymatischen Domäne und der CPD in das Zytosol. Zytosolisches IP6 bindet dann an die CPD, wodurch sie aktiviert und eine Autoprozessierung ausgelöst wird. Die freigesetzte enzymatische Domäne katalysiert die Übertragung eines Glucoserestes auf einen konservierten Threoninrest auf Rho/Ras-Proteinen, was Downstream-Signalübertragungswege blockiert.

bewirkt.^[21] Eine Toxinspaltung setzt die Glucosyltransferasedomäne in das Zytosol frei, wo sie die Pathogenese induziert.

CDI ist ein zunehmendes Problem, mit mindestens 250 000 eingelieferten Fällen pro Jahr, einer Sterblichkeitsrate von 1–2,5% und geschätzten Kosten von jährlich einigen Hundert Millionen Dollar in den USA.^[22] Orale Gabe von Vancomycin oder Metronidazol sind nachweislich die wirk-

samsten Therapien gegen CDI seit den 1980er Jahren.^[23] Neueste Studien mit Fidaxomicin, einem Schmalbandantibiotikum mit hoher Selektivität für *C. difficile* gegenüber anderen Bakterien, zeigte ähnliche Heilungsraten wie Vancomycin bei einer geringen Rückfallquote.^[24] Fidaxomicin wurde von der FDA im Mai 2011 genehmigt und könnte Vancomycin bei der Erstlinientherapie gegen CDI ersetzen.^[25]

Die Behandlung von CDI mit Antibiotika hat einige Nachteile: Erstens gibt es wachsende Bedenken bezüglich der Bildung Antibiotika-resistenter Stämme, die eine Therapie erschweren. Zweitens wurde von hohen Rückfallraten nach einer Antibiotikatherapie berichtet.^[23a] Drittens wurde eine steigende Zahl von Fällen gemeldet, die nicht auf Antibiotika ansprechen.^[26]

Therapien gegen *C.-difficile*-Toxine anstatt gegen das Bakterium selbst haben den Vorteil, die Homöostase der natürlichen Darmflora zu erhalten. Dies ist besonders wichtig, da bei Individuen mit einer gesunden Darmflora das Vorhandensein endogener Bakterien als schützende Barriere gegen die Vermehrung von *C. difficile* wirkt.

Stämme von *C. difficile*, die nicht die Toxine exprimieren, aber mit dem Pathogen konkurrieren können, befinden sich in Phase-II-Tests.^[27] In klinischen Studien verminderten ausschließlich menschliche monoklonale Antikörper gegen TcdA und TcdB bei gemeinsamer Verabreichung mit Antibiotika die Wahrscheinlichkeit eines CDI-Rückfalls.^[28] Außerdem befindet sich ein Toxoidvaksin, das die inaktivierten Toxine A und B enthält, derzeit in klinischen Tests der Phase II.^[29]

1.2. *Vibrio cholerae* (Cholera-Toxin)

Cholera ist eine Durchfallerkrankung, die von *V. cholerae* verursacht wird, einem Bakterium, das durch kontaminierte Nahrungsmittel und Wasser übertragen wird.^[30] Cholera ist in vielen Regionen endemisch, und die Weltgesundheitsorganisation schätzt die durch Cholera verursachten Todesfälle auf jährlich 120 000.^[31] Es ist oft schwierig, die Cholerasympptome von denen anderer Durchfallerkrankungen zu unterscheiden, was Diagnose und Meldung erschwert. Cholerasympptome umfassen voluminösen, wässrigen Durchfall und Erbrechen und treten nach einer Induktionszeit von 1–5 Tagen auf. Die Behandlung besteht aus einer einfachen parenteralen und/oder oralen Rehydrierung. Allerdings muss die Behandlung schnell erfolgen, da eine schwere Dehydrierung innerhalb weniger Stunden nach dem Beginn der Erkrankung zum Tod führen kann. Aus diesem Grund ereignen sich die meisten durch Cholera verursachten Todesfälle in Ländern mit eingeschränktem Zugang zu medizinischer Versorgung. Daher könnte unter solchen Umständen auch eine erfolgreiche Toxintherapie nur beschränkt helfen. Auch erschweren die großen Wassermengen, die vom Dünndarm abgegeben werden, die Entwicklung oraler Therapien. Prävention durch hygienische Maßnahmen, verbesserter Zugang zu medizinischer Versorgung und die Entwicklung von neuen oralen Impfstoffen sind höchstwahrscheinlich die Mittel, um durch Cholera verursachte Todesfälle zu verhindern.



Mattias Ivarsson erhielt 2010 seinen MSc in biomedizinischer Technik an der ETH Zürich im Rahmen des Excellence Scholarship and Opportunity Programme. Er ist derzeit Doktorand am Institut für pharmazeutische Wissenschaften bei Prof. J.-C. Leroux, wo er sich damit beschäftigt, neue Therapieansätze zur Behandlung von *C.-difficile*-Infektionen zu entwickeln.

CT ist ein Toxin vom AB₅-Typ, das aus einer enzymatischen A-Untereinheit und einer ringähnlichen pentameren B-Untereinheit besteht, die eine Rolle bei der Aufnahme in die Zelle spielt (Abbildung 4).^[32] Einzeln sind weder die A- noch die B₅-Untereinheit toxisch. Die A-Untereinheit besteht aus zwei Teilen: A1 ist der enzymatische Teil des Toxins, der für die Toxizität verantwortlich ist und der mit der pentameren B₅-Untereinheit über die A2-Domäne verknüpft ist. Die A1- und A2-Domänen sind über eine Disulfidbrücke verbunden.^[33]

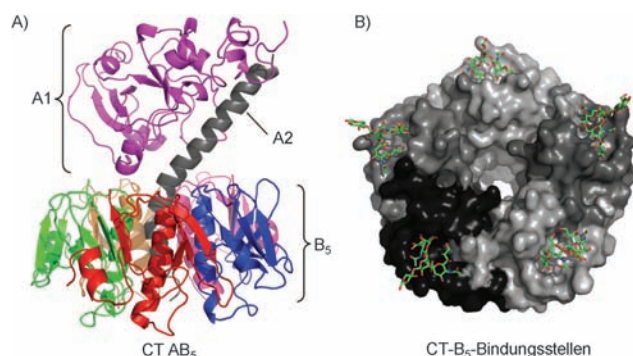


Abbildung 4. A) Die AB₅-Struktur des Cholera-Toxins (PDB: 1XTC).^[34] B) Die B₅-Untereinheit, kokristallisiert mit GM1 (PDB: 3CHB).^[35]

Die B₅-Untereinheit bindet an GM1-Ganglioside auf der Zelloberfläche (Abbildung 5).^[36] Nach der Endozytose wird das gesamte Toxin durch retrograden Transport über das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert.^[37] An dieser Stelle trennt sich die A1-Domäne vom A2-B₅-Komplex, entfaltet sich und wird in das Zytosol überführt, indem sie den ER-assoziierten Abbauweg nutzt.^[33,38] Die A1-Untereinheit ist eine ADP-Ribosyltransferase, die eine Substratspezifität für die trimere Gsα-Komponente der Adenylylcyclase (AC) aufweist. Sobald AC ADP-ribosyliert ist, bleibt sie in ihrer aktiven GTP-gebundenen Form, was zu erhöhten Konzentrationen von cyclischem AMP (cAMP) und Chloridionen führt, was im Anschluss eine massive Flüssigkeitsausscheidung aus dem Dünndarm auslöst.

CT ist zu ungefähr 80 % mit dem hitzelabilen Toxin (LT) von *E. coli* homolog und adressiert den gleichen Zelloberflächenrezeptor. Enterotoxigenes *E. coli* (ETEC), das LT und/oder das hitzeresistente Toxin (ST) produziert, ist für den so genannten Reisedurchfall verantwortlich, der von Cholera symptomatisch nicht unterscheidbar ist.

Aufgrund ihrer fehlenden Toxizität und starken antigenen Wirkung auf Schleimhäute ist die rekombinante B-Untereinheit von CT, zusammen mit verschiedenen inaktivierten *V. cholerae*-Stämmen, ein Teil des oralen Choleravakzins Ducoral.^[39] Eine Antikörpertherapie scheint in Situationen, in denen die Ausstattung mit grundlegender medizinischer Versorgung dürftig ist, wegen der Kosten und der schweren Belastungen für den Gastrointestinal(GI)-Trakt sehr unwahrscheinlich. Allerdings schützte Eigelb-IgY von Hennen, die mit inaktiverter B-Untereinheit aus Bakterien und von CT immunisiert worden waren, Saugferkel vor einer *V. cho-*

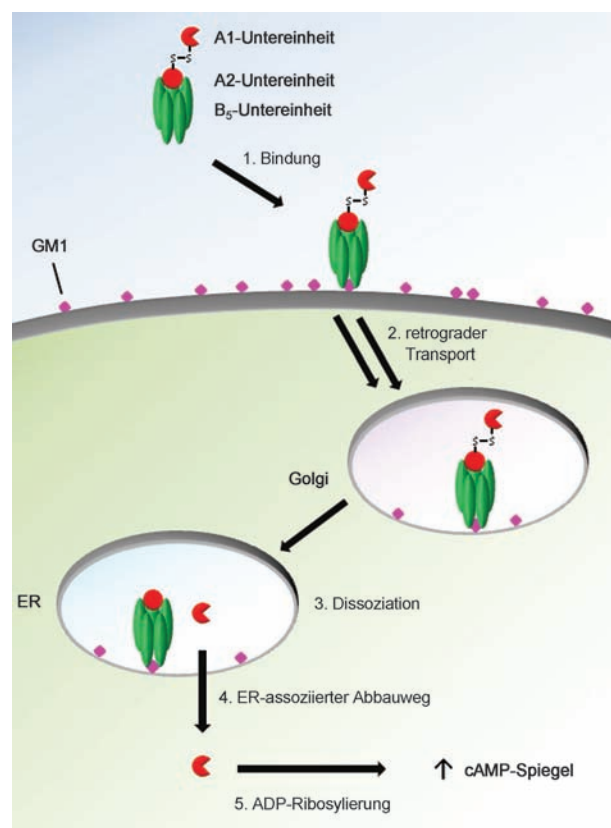


Abbildung 5. Molekularer Wirkmechanismus von CT. Das gesamte Toxin bindet an das GM1-Gangliosid mit nachfolgender Endozytose. Nach einem retrograden Transport über das TGN erreicht die A1-Untereinheit das Zytosol, wo sie die trimere Gsα-Komponente der Adenylylcyclase ADP-ribosyliert.

lerae-Infektion.^[40] IgY aus Eiern hat verschiedene Vorteile: Es kann billiger produziert, lyophilisiert und oral verabreicht werden.

1.3. Enterohämorrhagisches *Escherichia coli* (EHEC)

Das enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) ist ein wichtiges Pathogen, das durch Nahrungsmittel und Wasser übertragen wird und eine schwere Magen-Darm-Entzündung (so genannte „Hamburger-Krankheit“) hervorruft.^[41] Es produziert das phagenkodierte Shiga-like-Toxin (SLT, auch Shiga-Toxin oder Vero-Toxin) als seinen hauptsächlichen Virulenzfaktor. Das Shiga-Toxin, der Namensvetter der SLTs, war ursprünglich bei der Untersuchung von *Shigella dysenteriae* entdeckt worden, welches das Toxin produziert. Der Name wurde aber beibehalten, um die sehr nahe verwandten SLTs zu beschreiben, die von *E. coli* produziert werden. Das Stx aus *S. dysenteriae* und das Stx1 aus *E. coli* sind fast identisch. Stx1 und Stx2, ein anders SLT, das von manchen EHEC-Stämmen produziert wird, weisen ungefähr 60 % Sequenzhomologie auf. Der hauptsächliche Verursacher der Ausbrüche in Europa und Nordamerika ist üblicherweise *E. coli* O157:H7, auch wenn einige kürzliche Ausbrüche in Europa vom O104:H4-Stamm ausgelöst

wurden.^[41,42] SLTs werden von Bakterien im Lumen des GI-Trakts freigesetzt, was Durchfall verursacht; sie durchdringen anschließend die Submucosa des Darms und gelangen in den Blutkreislauf. Dies kann, besonders bei Kindern, akute Nierenschädigung und Komplikationen im Zentralnervensystem hervorrufen.^[43] In Regionen, wo das Bakterium endemisch ist, ist EHEC die Ursache für die meisten aller hämolytisch-uremischen Syndrome (HUS) bei Kindern. HUS ist eine lebensbedrohliche Krankheit, allerdings sind die derzeitigen Therapien hauptsächlich unterstützend, und Antibiotika sind möglicherweise sogar schädlich,^[44] vielleicht wegen der bakteriellen Lyse oder einer erhöhten SLT-Produktion.^[45] Der normale Verlauf einer Infektion mit *E. coli* O157:H7 führt drei Tage nach der Infektion mit dem Bakterium zu Durchfall, 1–3 Tage später gefolgt von blutigem Durchfall.^[46] Dies ist normalerweise der Zeitpunkt, zu dem der Patient medizinischen Rat sucht, und ein Bakterienkulturtest zeigt, dass EHEC-Bakterien vorhanden sind. Die Krankheit kann im Anschluss abklingen, aber sich auch zu HUS verschlechtern. HUS ist durch mikrovaskuläre Blutgerinnsel und geschwollene endotheliale Nierenzellen gekennzeichnet, was von zirkulierenden SLTs hervorgerufen wird. Sobald das Vorhandensein von EHEC nachgewiesen ist, ist die vom Toxin verursachte Schädigung normalerweise schon weit fortgeschritten, was schnelle Maßnahmen ausschlaggebend für den Erfolg aller Toxintherapien macht.^[46] Neueste Berichte belegen, dass beim HUS die Nierenschädigung durch SLTs teilweise durch das Komplementsystem vermittelt wird und dass der monoklonale C5-Antikörper Eculizumab bei Kindern zur Behandlung von HUS nützlich sein kann.^[47]

SLTs sind Toxine des AB₅-Typs, ähnlich wie CT (Abbildung 6).^[48] Das zusammengesetzte Toxin wechselwirkt über seine B₅-Untereinheit mit dem Globotriaosylceramid Gb₃^[49] auf der Zelloberfläche, was eine Endozytose nach sich zieht (Abbildung 7).^[50] und wird über retrograden Transport vom Endosom zum ER überführt.^[51] Die A-Untereinheit besteht aus zwei Teilen: Die N-terminale A1-Domäne ist die enzy-

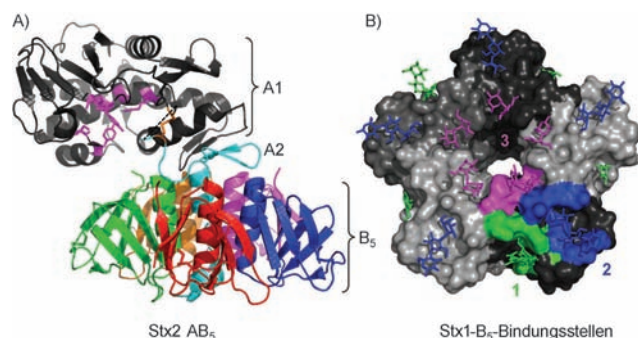


Abbildung 6. A) Struktur von Stx2. Das B-Pentamer ist vielfarbig, die A2-Untereinheit cyan und die A1-Untereinheit schwarz dargestellt. Die enzymatische Bindungstasche ist in Magenta und die Disulfidbrücke, die die A1- und A2-Untereinheiten verbindet, in Orange hervorgehoben. Die Schleife, die eine proteolytische Spaltung eingeht, ist nicht in der Kristallstruktur enthalten und wird durch eine schwarze gepunktete Linie dargestellt (PDB: 1R4P).^[34,48] B) Bindungsstellen von Stx1. Die Punkte 1–3 sind an einer B-Untereinheit grün, blau bzw. magenta hervorgehoben, und die kokristallisierten Kohlenhydrate sind in den zugehörigen Farben gezeigt (PDB: 1B0S).^[57]

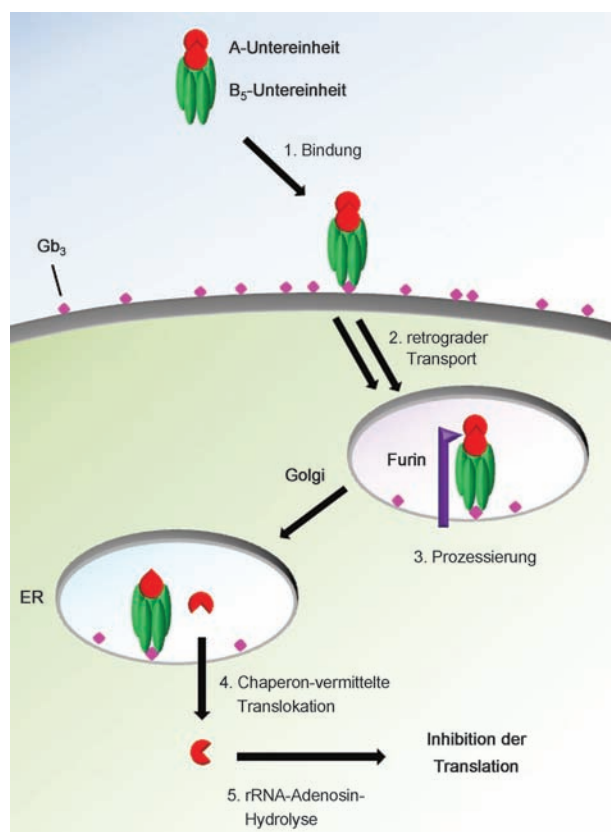


Abbildung 7. Molekularer Wirkmechanismus von SLTs aus *E. coli*. Die B₅-Untereinheit bindet an den Zelloberflächenrezeptor. Das Toxin durchläuft anschließend den retrograden Transport zum ER, in dessen Verlauf es von Furin prozessiert wird, was die enzymatische A1-Untereinheit vom A2-B₅-Komplex freisetzt. Die A1-Untereinheit wird nachfolgend in das Zytosol überführt, wo sie letztlich die Proteinsynthese verhindert.

atische Domäne, die durch eine Protease von der C-terminalen A2-Domäne freigesetzt wird, die mit dem B-Pentamer wechselwirkt (Abbildung 6). Die proteolytische Spaltung wird durch Proprotein-Konvertasen wie Furin im Golgi-Apparat und im Endosom vermittelt.^[52] Die Reduktion einer Disulfidbindung ist ebenfalls für eine vollständige Freisetzung der A1-Untereinheit nötig, die schließlich über Chaperon-vermittelten Transfer das Zytosol erreicht,^[53] wo sie auf die 28S-RNA der ribosomalen 60S-Untereinheit wirkt.^[54] Die A-Untereinheit der SLTs und das nahe verwandte Ricin-Toxin (RT, *Ricinus communis*) sind beides N-Glycosidasen, die letztlich die Proteinsynthese unterbinden.^[54,55] Ein anderes AB₅-Toxin, Subtilase-Cytotoxin (SubAB), das von *E. coli* freigesetzt wird, wurde kürzlich entdeckt.^[56] SubAB kann pathologische Merkmale hervorrufen, die denen von HUS in Mäusen ähneln. Seine Bedeutung für HUS im Rahmen einer EHEC-Infektion ist allerdings weiterhin unklar.

Von den beiden Toxinen wurde Stx2 mit schwerwiegenden Krankheitsverläufen in Verbindung gebracht und ist deshalb das wichtigste Ziel für therapeutische Maßnahmen.^[58] Stx1 und Stx2 unterscheiden sich leicht in ihrer Kohlenhydrat bindenden Domäne. Stx2 wurde, anders als Stx1, noch nicht in der Gegenwart von gebundenem Koh-

lenhydrat kristallisiert.^[57] Stx1 hat drei verschiedene Bindungsstellen, die alle wichtige Rollen für die Zytotoxizität spielen (Abbildung 6B).^[59] Allerdings scheint das Gb₃-Trisaccharid in Lösung hauptsächlich an die Bindungsstelle 2 zu binden, zum Teil an Bindungsstelle 1, aber nicht an Bindungsstelle 3.^[57,60] Kürzlich wurde gezeigt, dass Stx2 eine höhere Bindungsaffinität zu einem *N*-Acetylgalactosamin-terminierten Gb₃ aufweist und dass diese Bevorzugung mit der Bindungsstelle 2 zusammenhängt.^[61] Das Bakterium kann SLTs in Außenmembranvesikel sezernieren, aber die Bedeutung dieses Sachverhalts in der Pathogenese bleibt weiter unklar.^[62]

Drei humanisierte Maus-IgG1k-Antikörper gegen SLTs wurden in Phase-I-Studien getestet.^[63] Außerdem werden derzeit humane monoklonale Antikörper untersucht: α Stx1 und α Stx2 (Shigamabs), die gegen die Stx1 B- bzw. Stx2 A-Untereinheit gerichtet sind, und Urtoxazumab (TMA-15), das gegen die Stx2B-Untereinheit gerichtet ist.^[43,64] Sie alle wurden an gesunden Erwachsenen getestet, und zudem wurde die Sicherheit von Urtoxazumab in EHEC-infizierten Kindern bewertet. Beide Formulierungen zeigten sich als gut verträglich, mit Halbwertszeiten von über neun Tagen, sodass eine einzige Injektion beim ersten Auftreten von Symptomen theoretisch bis zum Ausbruch von HUS genügen sollte. Es muss sich noch erweisen, ob diese Antikörper einen Schutz bieten, wenn sie Patienten verabreicht werden, bei denen nach eine paar Tagen Durchfall EHEC diagnostiziert wird. Ein anderes wichtiges Problem für die Entwicklung von Therapien gegen solche seltenen Krankheiten besteht darin, eine angemessene klinische Studie mit klaren primären Endpunkten zu entwerfen und eine Testgruppe zur Verfügung zu haben, die groß genug ist, um statistische Signifikanz zu erreichen. Dies ist sicherlich ein echtes Problem bei HUS, auch wenn Länder mit einem erhöhten Vorkommen, wie Argentinien, große Testgruppen bieten könnten.^[2a] Solche Länder mit endemischen EHEC-Infektionen könnten auch möglicherweise von einem Impfstoff gegen EHEC oder gegen dessen Toxine profitieren. Der Nutzen einer solch weitverbreiteten Immunisierung in anderen Ländern ist unklar.

1.4. *Bacillus anthracis* (Anthrax-Toxin)

Das Anthrax-Toxin ist ein dreiteiliges Toxin, das vom Sporen bildenden Bakterium *Bacillus anthracis* abgesondert wird.^[65] Eine Infektion mit *B. anthracis* kann kutan, gastrointestinal oder pulmonal (durch Inhalieren) erfolgen, was alles, falls nicht angemessen behandelt, zu einer systemischen Milzbranderkrankung mit tödlichem Ausgang führen kann.^[66] Milzbrand (vor allem Lungenmilzbrand) beim Menschen wird intensiv beforscht, da die Sporen von *B. anthracis* besonders elastisch sind und schnell in eine Aerosolform überführt werden können, wodurch sie als biologische Waffe missbraucht werden können.^[67]

Die drei Proteine, aus denen das Anthrax-Toxin zusammengesetzt ist, heißen Lethal Factor (LeF), Edema Factor (EF) und Protective Antigen (PA).^[65] LeF ist eine Zink-Protease, die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen (MKK)

am Aminos terminus spaltet.^[68] EF ist eine Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase, die die zytosolische Konzentration an cAMP auf pathologische Konzentrationen erhöht.^[69] PA wird als 83-kDa-Protein freigesetzt, das an einen von zwei zellulären Rezeptoren bindet: Tumor Endothelial Marker 8 (TEM8 oder ANT XR1) oder Capillary Morphogenesis Protein 2 (CMG2 oder ANT XR2).^[70] PA₈₃ wird von einer Protease auf der Zelloberfläche oder in extrazellulärer Umgebung zu einem 63 kDa schweren Protein gespalten, wodurch seine Heptamerisierung in eine ringähnliche Struktur ermöglicht wird (Abbildungen 8 und 9).^[71] PA₈₃ ist besonders

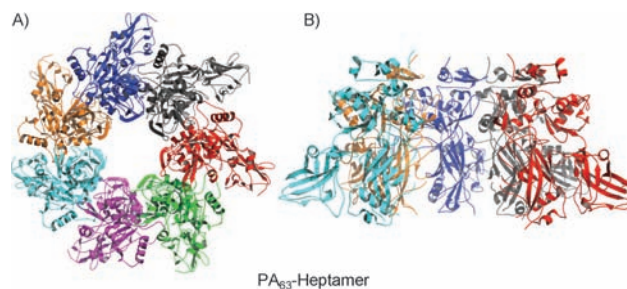


Abbildung 8. Kristallstruktur der heptameren Präpore von PA₆₃.

A) (PA₆₃)₇ von oben aus betrachtet. B) Seitenansicht des gleichen Heptamers. Zwei Monomere wurden zur Veranschaulichung entfernt (PDB: 1TZO).^[76]

empfindlich gegen eine Spaltung durch Furin und andere Proprotein-Konvertasen (PCs).^[72] Ist PA einmal gespalten, an die Zelloberfläche gebunden und heptamerisiert, bindet es an LeF und/oder EF, und der Komplex wird über Clathrin-abhängige Endozytose aufgenommen. Die Ansäuerung des Endosoms führt zu einer Einbindung von (PA₆₃)₇ in die Membran und zur Bildung einer Pore, durch die gebundenes LeF und/oder EF schließlich in das Zytosol übergehen.^[70,73] PA-assoziiertes LeF und EF sind als Lethal Toxin (LeT) bzw. Edema Toxin (ET) bekannt, wobei LeT als der Hauptvirulenzfaktor gilt.^[74] Keines dieser drei Proteine ist alleine toxisch.^[75]

Antibiotika, Impfungen und passive Immunisierung werden alle als Milzbrandprophylaxe eingesetzt.^[67] Zwar verhindern diese Mittel wirkungsvoll den Ausbruch von Milzbrand, jedoch ist im Falle einer plötzlichen und unerwarteten Verbreitung von Anthrax-Sporen anstatt vorbeugender Maßnahmen ein Zugang zu effizienten Therapien notwendig. Die empfohlene Therapie gegen Milzbrand beschränkt sich derzeit auf eine Verabreichung von Antibiotika.^[77] Allerdings kann trotz effizienter Eliminierung von *B. anthracis* eine Toxinanhäufung in infizierten Patienten immer noch zum Tod führen, vor allem bei Lungenmilzbrand, wo die Krankheit sehr schnell fortschreitet.^[4b] Beendete klinische Tests der Phase III sowie Tierversuche an Hasen und Affen mit Raxibacumab, einem humanen monoklonalen Antikörper, der gegen PA gerichtet ist, sprechen dafür, dass eine Therapie gegen Anthrax-Toxine alleine zur Behandlung einer *B. anthracis*-Infektion ausreicht.^[78] Allerdings führt die große Flexibilität von PA dazu, dass es leicht in eine Antikörper-resistente Form umgewandelt werden kann.^[79] Zusammen mit den hohen Kosten des Antikörpers und den Dosierungsbeschränkungen (40 mg kg⁻¹) spornt diese Tatsa-

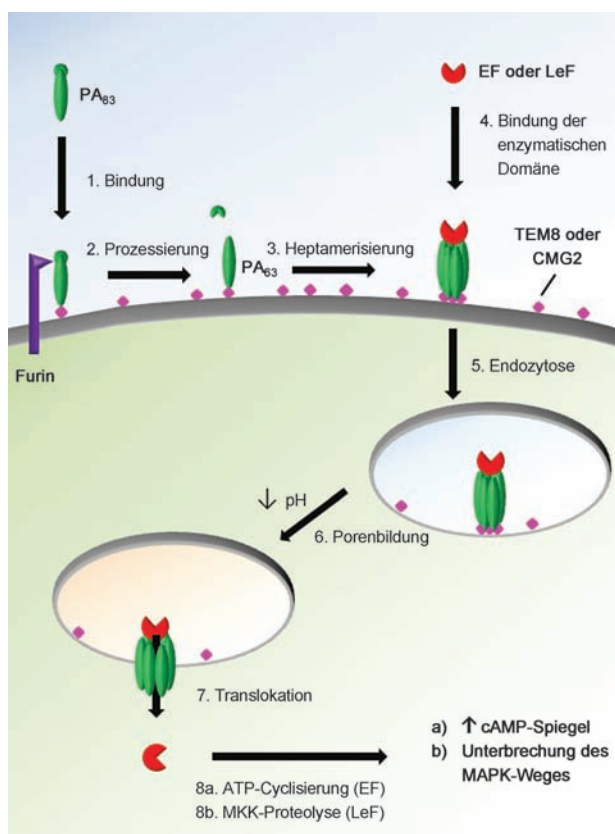


Abbildung 9. Molekularer Wirkmechanismus von Anthrax-Toxin. Schützendes Antigen (PA_{63} ; Größe: 83 kDa) bindet entweder TEM8 oder CMG2 auf der Zelloberfläche und wird von PCs wie Furin zu PA_{63} prozessiert. PA_{63} heptamerisiert, was die Anbindung von EF und/oder LeF ermöglicht. Der gebildete Komplex wird durch Endozytose aufgenommen, und anschließende Ansäuerung des Endosoms führt zu einer Translokation des gebundenen EF und/oder LeF. Einmal im Zytosol, katalysiert EF die Bildung von cAMP aus ATP, und LeF vermittelt die proteolytische Spaltung von MKKs, die den Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweg unterbrechen.

che zur Entwicklung von nichtantibiotischen Toxintherapien für die Behandlung von Milzbrand an. Bei der Beurteilung der Wirksamkeit neuer Therapien ist die Seltenheit des Lungenmilzbrands allerdings ein erhebliches Hindernis.^[80]

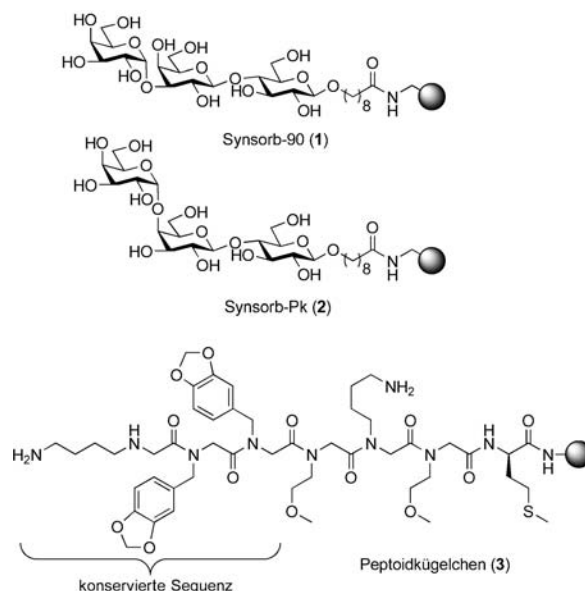
2. Nichtantibiotische Therapieansätze

2.1. Therapien gegen Toxinbindung/-zusammenlagerung

Alle Toxine des A-B-Typs, die hier vorgestellt werden, üben ihre Wirkung auf intrazelluläre Proteine aus und müssen deshalb die Zellmembran durchdringen, um die Krankheit auszulösen. Die Anbindung des Toxins an die Zelloberfläche vor der Internalisierung ist einer der ersten Schritte der Pathogenese und damit ein vielversprechender Angriffspunkt für Wirkstoffe. Einige Methoden wurden vorgeschlagen, um die Bindung des Toxins an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche zu unterbinden, von unlöslichen Sorptionsmitteln und Polymeren hin zu optimierten multivalenten Liganden.

2.1.1. Unlösliche Sorptionsmittel

Prinzipiell können unlösliche Sorptionsmittel gegen Toxine, die im GI-Trakt freigesetzt werden, oral verabreicht werden, an das Toxin binden und ohne systemische Absorption mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Synsorb ist ein Sorptionsmittel, das hergestellt wird, indem ein Toxin bindender Kohlenhydratligand an Chromosorb P gebunden wird. Synsorb-90 (gegen TcdA von *C. difficile*) und Synsorb-Pk (gegen SLTs aus *E. coli*) wurden in klinischen Studien getestet, führten aber letztlich nicht zum Erfolg (1 bzw. 2; Schema 1).^[81] In einer Testreihe der Phase II verringerte Synsorb-Pk bei Kindern nicht den Schweregrad von HUS. Es wäre naheliegend, aus dieser Studie den Schluss zu ziehen, dass nach einem Krankenhausaufenthalt eine Therapie gegen SLTs im GI-Trakt zu spät kommt, möglich ist aber auch, dass die Wirksamkeit von Synsorb-Pk in vivo nicht ausreichte, um einen Effekt zu beobachten, vielleicht weil seine Neutralisierungsaktivität gegen Stx2 geringer als die gegen Stx1 ist.^[82] Wahrscheinlich wäre jedoch eine Therapie gegen SLTs im Blutkreislauf wirksamer.



Schema 1. Struktur der oralen, unlöslichen Wirkstoffe gegen TcdA aus *C. difficile* (1), Stx aus *E. coli* (2) und CT aus *V. cholerae* (3).

Synsorb-90 enthält das Trisaccharid $\alpha\text{Gal}(1-3)\beta\text{Gal}(1-4)\beta\text{Glc}$, das bekanntermaßen an die Rezeptor bindende Domäne von TcdA und TcdB bindet.^[83] In einer Konzentration von 200 mg kg^{-1} schützte Synsorb-90 im Mausmodell vor TcdA-Enterotoxizität. Allerdings erzielte sogar nicht funktionalisiertes Chromosorb P in Konzentrationen von 400 mg kg^{-1} eine Wirkung, was darauf schließen lässt, dass unspezifische Wechselwirkungen eine Rolle spielten.^[84] Synsorb-90 scheiterte in Tests der Phase III möglicherweise aus zwei Gründen:^[81b] Zum einen ist heute bekannt, dass TcdB bei der Krankheitsentstehung mindestens genauso wichtig ist wie TcdA, wobei Synsorb-90 nur gegen TcdA wirkte. Dies ist

eine interessante Beobachtung, da der Kohlenhydratligand prinzipiell dazu imstande sein sollte, auch mit der Rezeptor bindenden Domäne von TcdB wechselzuwirken.^[85] Ein weiterer möglicher Faktor ist, dass die Chromosorbpartikel zu groß sind, um in die Schleimhautschicht einzudringen, die die Enterozyten schützt, während *C. difficile* bekanntermaßen diese Schicht durchdringen kann.^[6,86] Wahrscheinlich muss ein erfolgreicher Wirkstoff auch die Schleimhaut durchdringen, um die Internalisierung der Toxine zu verhindern.

In den vorhergehenden Beispielen wurden Kohlenhydrate dazu eingesetzt, spezifische Bindungen der „Köderverbindung“ (decoy) mit dem Toxin aufzubauen. Screening-Kampagnen können dafür genutzt werden, neue Peptide oder Peptoidstücke zu identifizieren, die selektiv an Toxine binden, sogar wenn der native Rezeptor ein Kohlenhydrat ist. Peptide sind künstliche Peptidanaloga, deren Seitenketten an die Amidstickstoffatome auf einem Polyglycinerückgrat gebunden sind. Da Peptide resistent gegen enzymatischen Verdau sind, sind sie vielversprechend als orale Köder. Ein Peptoid-funktionalisiertes Tentagelkugelnchen, das an CT aus *V. cholerae* bindet, wurde identifiziert, indem eine Bibliothek von bis zu 10^5 Kandidatenmolekülen durchmustert wurde (3; Schema 1).^[87] Es ergaben sich zwei Treffer, die beide die gleiche Konsensussequenz enthielten und die ohne die zwei letzten, nicht konservierten Reste neu synthetisiert wurden. Kugelnchen, die mit dieser Konsensussequenz funktionalisiert wurden, schützten Zellmonoschichten im Darm vor CT, ungeachtet einer vorherigen Inkubierung der Kugelnchen mit dem Toxin. Letztlich könnte die orale Therapie gegen Cholera jedoch durch voluminösen Durchfall erschwert werden.

2.1.2. Lösliche Köder

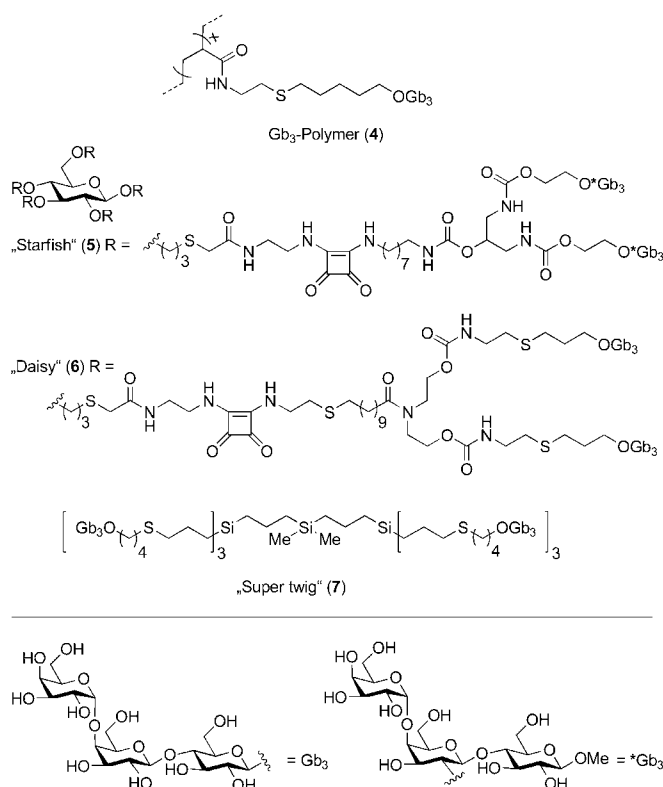
Lösliche Formen von nativen Rezeptoren, die an der Bindung und Internalisierung von Toxinen beteiligt sind, können als Köder verwendet werden. Diese Methode wurde gegen PA aus *B. anthracis* eingesetzt,^[88] mit dem Vorteil, dass das Toxin nicht in der Art modifiziert werden kann, dass die Rezeptorbindung umgangen wird, ohne seine Wirksamkeit zu beeinträchtigen. Lösliche Fragmente der PA-Rezeptoren TEM8 und CMG2 wurden in Säugetierzellen exprimiert und in vitro sowie in vivo getestet. Im Falle einer Koinjektion mit gleichen oder fast äquimolaren Mengen an LT entfaltete der sCMG2-Köder bei Ratten eine Schutzwirkung. STEM8 war in vitro weniger wirksam und schützte Ratten bei Infektionsversuchen nicht. Die Unterschiede in der Wirksamkeit wurden den Unterschieden in der Bindungsaffinität zwischen löslichem Köder und PA zugeschrieben. Tatsächlich weist sCMG2 eine Bindungsaffinität von 170 pM für PA gegenüber 130 nM für sTEM8 auf. Kürzlich zeigte eine mutierte Form von sTEM8 (L56A) eine erhöhte Affinität für PA und eine Schutzwirkung in vivo, ähnlich der von sCMG2.^[89] In dieser Studie erbrachte der lösliche L56A-Köder gegenüber sCMG2 eine gesteigerte Plasmahalbwertszeit und eine verbesserte Wirkstoffanreicherung in der Lunge, was seine sCMG2-ähnliche Wirkung in vivo trotz geringerer PA-Affinität erklärt. Der lösliche sCMG2-Köder wurde kürzlich bei einer Infektion von Mäusen mit modifizierten Toxinen, die resistent gegen Antikörper sind, getestet. Wie erwartet behielt die

lösliche Köderverbindung in den Mäusen weiter ihre Schutzfunktion.^[79] Die Halbwertszeit von sCMG2 im Kreislauf wurde durch Verknüpfung mit einem Fc-Antikörperfragment drastisch auf fünf Tage erhöht.^[90] Dieser Ansatz bietet vielleicht eine interessante Ergänzung oder alternative Therapie zur Antikörperbehandlung, besonders bei Fällen einer Exposition gegenüber als Biowaffe eingesetztem Anthrax.

2.1.3. Polymere/oligomere Bindungsstoffe

Polymere Bindungsstoffe sind Makromoleküle, die dazu entwickelt werden, Moleküle im GI-Trakt zu binden und deren Absorption zu verhindern.^[91] Diese Polymere werden selbst nicht absorbiert und sind daher normalerweise ungiftig. Zum Beispiel werden Cholestyramin und Colesevelam dafür verwendet, Salze der Gallensäure zu binden und ihre Reabsorption zu verhindern, was eine Verminderung von Cholesterol im Plasma bewirkt.^[92] Andere Polymere werden bei der Behandlung von Hyperkaliämie (Kayexalat) und Hyperphosphatämie (Sevelamer) eingesetzt, und weitere werden getestet, besonders für die Behandlung von Zöliakie.^[93] Tolevamer ist ein polymerer Bindungsstoff, der zum Abfangen von *C. difficile*-Toxinen entwickelt wurde.^[94] Dieses Polymer lieferte gute Resultate bei Tests der Phase II, besonders bei CDI-Rückfällen, aber versagte in klinischen Phase-III-Studien in einem Nichtunterlegenheitstest gegen Metronidazol und Vancomycin.^[81b] Das Polymer musste in hohen Konzentrationen eingesetzt werden (9 g Tag^{-1}), möglicherweise wegen unspezifischer Wechselwirkung mit Mucinen oder anderen Proteinen. Tolevamer ist ein hochmolekulares Polystyrolsulfonat, das über elektrostatische und mehrere schwache hydrophobe Wechselwirkungen an TcdA und (in geringerem Ausmaß) an TcdB bindet.^[95] Die Fähigkeit des Polymers zur Bindung an TcdB war vielleicht nicht ausreichend angesichts der mittlerweile erkannten Bedeutung von TcdB bei der Pathogenese.

Polymere können mit Erkennungsstrukturen wie Kohlenhydraten modifiziert werden, um ihre Spezifität zu verbessern. Solche Glycopolymere wurden größtenteils dazu eingesetzt, um Bakterientoxine und andere Virulenzfaktoren wie Adhäsine zu binden.^[96] Beispielsweise wurde gezeigt, dass das Gb₃-Trisaccharid (der Rezeptor für SLTs), gebunden an ein Polyacrylamidrückgrat (4; Schema 2), Stx1 wie auch Stx2 bindet und deren Zytotoxizität hemmt.^[97] Darüber hinaus wurde entdeckt, dass das Polymer wirksam war, wenn es Mäusen am dritten Tag nach Gabe einer letalen Dosis von *E. coli* O157:H7 oral verabreicht wurde.^[97a] Diese Befunde stehen jedoch im Gegensatz zu einem vorherigen Bericht, dem zufolge das Gb₃-Polymer an Stx1, nicht aber an Stx2 binden kann.^[98] Die Autoren vermuten, dass der aliphatische Linker zwischen Gb₃ und Polymerrückgrat eine aktive Rolle bei der erfolgreichen Anbindung von Stx2 spielt, was die unterschiedlichen Befunde erklärt.^[99] Die Forscher schlugen vor, dass dieses Polymer ein nützlicher prophylaktischer Wirkstoff für Menschen sein könnte, die mit EHEC-Patienten in Kontakt gekommen sind oder die bei einem Ausbruch EHEC ausgesetzt waren.^[100]



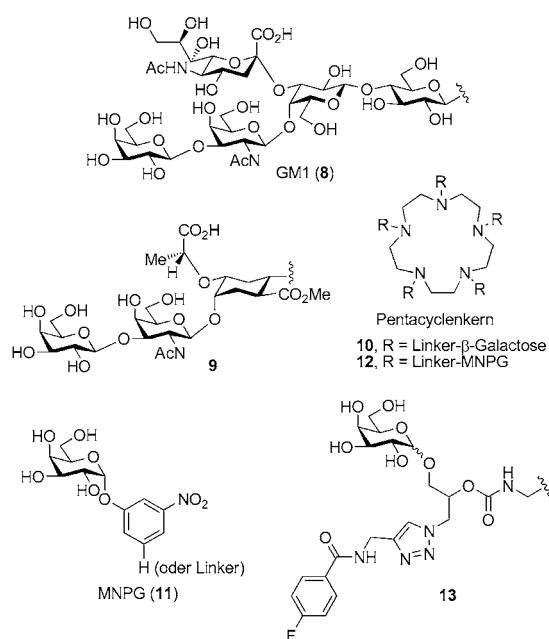
Schema 2. Multivalente Präsentation von Gb₃ zur Hemmung von SLT.

Wegen ihrer einzigartigen pentameren Strukturen standen SLTs und CT im Mittelpunkt vieler eleganter Studien, bei denen multivalente Anordnungen von Kohlenhydratmolekülen eine hohe Bindungsaffinität für Toxine zeigten. Eines der bemerkenswertesten Beispiele ist eine pentavalente Anordnung von Gb₃-Trisacchariden zur SLT-Bindung (Starfish (5); Schema 2).^[101] Das Design beruht auf einem Glucosekern mit fünf strahlenförmig ausgerichteten Abstandhaltern mit jeweils zwei Gb₃-Trisacchariden am Ende, die über ihre zentralen Galactosereste angeknüpft sind.^[102] Starfish wechselwirkte mit subnanomolarer Affinität mit Stx1 und mit niedriger nanomolarer Affinität mit Stx2. Das 5 × 2-Kohlenhydratdesign war ursprünglich dazu gedacht, zwei Bindungsstellen an jeder B-Untereinheit zu besetzen. Allerdings zeigte die Kristallographie, dass Starfish zwischen zwei B₅-Pentameren angeordnet war, wobei jede Gb₃-Einheit an nur eine Bindungsstelle band. Starfish und Daisy (6; Schema 2), ein ähnliches Konstrukt, bei dem die Gb₃-Trisaccharide über eine endständige Kohlenhydrateinheit angeknüpft sind, wurden in vivo getestet.^[103] Bei subkutaner Koinjektion einer letalen Dosis von Stx1 oder Stx2 zeigte Daisy eine schützende Wirkung, wogegen Starfish nur gegen Stx1 wirksam war. Die größere Wirksamkeit von Daisy gegen Stx2 wurde der Flexibilität des Linkers zugeschrieben, auch wenn dessen Ausrichtung und hydrophobe Natur ebenfalls eine Rolle gespielt haben könnten, wie es bei den Gb₃-Polyacrylamiden der Fall war. In einem Mausmodell, das mit dem *E. coli*-Stamm O91:H21 infiziert wurde, schützte eine tägliche subkutane Dosis von Daisy 24 h nach der Verabreichung der Bakterien 50 % der Mäuse vor dem Tod. Insgesamt zeigt Daisy in vitro

eine geringere Wirksamkeit als Starfish, aber übertrifft es in vivo, möglicherweise wegen unterschiedlicher pharmakokinetischer Profile. Andererseits könnte sich die Biodistribution oder Ausscheidung des Toxins mit Daisy unterscheiden. Die Autoren verfolgten nur die Wirkung von Starfish auf die Biodistribution von ¹²⁵I-markiertem Stx1 und Stx2. Es wurde gezeigt, dass Starfish die Radioaktivität in Niere, Hirn, Milz und Leber für Stx1 verringert, nicht aber für Stx2.

Ein Kern aus dendritischem Carbosilan wurde auch dafür verwendet, Gb₃-Trisaccharide in multivalenter Form zu präsentieren.^[104] Die hexavalente Komponente mit dem Namen Super Twig(1)6 (7; Schema 2) bot Mäusen bei Koinjektion einer letalen Dosis Stx2 kompletten Schutz.^[105] In einem *E. coli*-O157:H7-Infektionsmodell konnte Super Twig Mäuse schützen, wenn es ihnen zweimal täglich injiziert wurde (beginnend am dritten Tag). Hier korrelierten die In-vitro-Bindungsaffinitäten verschiedener Konstrukte wiederum nicht notwendigerweise mit der Wirksamkeit in vivo. Die Autoren identifizierten die Fähigkeit des Komplexes, Aufnahme und Abbau in Makrophagen zu fördern (vielleicht durch Scavenger-Rezeptoren), als einen wichtigen Faktor für die In-vivo-Aktivität. Im Vergleich mit einer Injektion des markierten Toxins alleine konnte Super Twig bei Koinjektion mit ¹²⁵I-markiertem Stx2 die Menge an Radioaktivität, die aus Leber und Milz rückgewonnen wird, tatsächlich erhöhen. Diese Beispiele demonstrieren, dass eine Bindung in vitro nicht immer die Wirksamkeit in vivo voraussagt und dass Parameter wie das pharmakokinetische Profil und das Schicksal des Toxin bindenden Komplexes genauso wichtig sind.

2007 wurde ein Fulleren-Glycokonjugat mit fünf Gb₃-Trisacchariden synthetisiert, aber kein Toxin-Bindungs-Assay beschrieben.^[106] Die Funktionalisierung von Oberflächen oder Goldnanopartikeln mit Gb₃-Glycokonjugaten führt auch zu guten Bindungsaffinitäten, die zur Detektion und Analyse genutzt werden könnten.^[107] CT aus *V. cholerae* und das eng verwandte LT aus *E. coli* sind beides AB₅-Toxine, die auch Gegenstand zahlreicher Untersuchungen mit dem Ziel waren, Inhibitoren ihrer Wechselwirkung mit dem natürlich Rezeptor (dem Pentasaccharid GM1) zu finden. Dendrimere wurden mit GM1 funktionalisiert (8; Schema 3).^[108] Die multivalente Anordnung ergab eine starke Verbesserung gegenüber dem monomeren Liganden alleine. Wegen der Komplexität der GM1-Pentasaccharide wurden einfachere Moleküle für eine multivalente Anordnung erforscht. Das GM1-Mimetikum 9 (Schema 3), bei dem die Sialinsäure durch Milchsäure-Einheiten ersetzt und die verzweigte Lactose vereinfacht ist, wurde auf Dendrimere aufgebracht und erzielte eine wirksamere Hemmung als GM1.^[109] Der endständige Galactoserest befindet sich am tiefsten in der Toxinbindungstasche, und ein einfacher, sternförmig um einen pentacyclischen Kern angeordneter β-Galactoserest (10) lieferte ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität, wenngleich noch immer niedriger als der natürliche GM1-Ligand^[106] (Schema 3).^[110] Für eine optimale Bindung wurde die Länge des Linkers in diesem Fall so modifiziert, dass er zur Größe des Toxins passte. 2007 wurde gezeigt, dass Dendrimere mit vier oder acht Galactoseresten eine inhibierende Wirkung auf CT ähnlich zu GM1 zeigen.^[111] Vergleichbare Kohlenhydrat-



Schema 3. Der LT- und CT-Rezeptor GM1 und vereinfachte Analoga.

funktionalisierte Dendrimere wurden auf Oberflächen eingesetzt, um die Auswirkungen der Multivalenz auf Mikroarrays zu testen.^[112] Eine Studie der Struktur-Wirkungs-Beziehungen zur Identifizierung von verbesserten Liganden ergab, dass *m*-Nitrophenyl- α -D-galactosid (MNPG (**11**); Schema 3) in einem Verdrängungs-Assay mit LT und CT 100-mal wirksamer war als Galactose.^[113] Zwar ist diese Substanz in ihrer Wirksamkeit immer noch vier Größenordnungen von GM1 entfernt, sie bildet aber einen guten Ausgangspunkt für das Design eines multivalenten Bindungsstoffes. Die Präsentation von MNPG in einer pentavalenten Form (**12**) ergab in einem Verdrängungs-Assay mit CT tatsächlich eine 260-fach höhere Affinität als der monomere Ligand.^[114] Allerdings konnte die optimale Länge des Linker-Arms, der vorher an das Galactosekonstrukt **10** angepasst worden war, wegen Löslichkeitsproblemen nicht mit MNPG reproduziert werden, sodass die Länge von **12** nicht optimal – aber doch wirksam – war. Eine spätere Studie untersuchte die Wirksamkeit von „nicht überspannenden“, divalenten MNPG-Molekülen, bei denen der Abstand zwischen den beiden Liganden zu klein ist, um gleichzeitig zwei Bindungsstellen zu adressieren.^[115] Die verbesserte Hemmwirkung des Dimers gegenüber jener des Monomers kann in diesem Fall nicht durch Multivalenz erklärt werden; vielmehr wurde eine sterische Inhibierung als Erklärung vorgeschlagen. Eine Strategie zur Verbesserung der Bindungsaffinität eines Kohlenhydrats über die Multivalenz hinaus besteht darin, eine zusätzliche Bindung mit einem Nichtzuckermolekül einzurichten, wie durch das Anhängen einer Nitrophenolgruppe an die Galactose zur Bindung von CT und LT demonstriert wurde. Bei einem kürzlich vorgestellten, Fragment-basierten Ansatz wurde ein multivalenter Galactoserest mit angeknüpftem Azid durch Klickreaktionen mit einer Bibliothek einfacher Alkine umgesetzt.^[116] Screening der daraus resultierenden Bibliothek in einem Verdrängungs-Assay mit CT erbrachte

einen im geringen nanomolaren Bereich wirkenden, multivalenten Inhibitor (**13**; Schema 3). Der monomere Ligand zeigte eine ähnliche Affinität wie monomeres MNPG.

Es ist schwierig, Glycopolymere mit kontrolliertem Abstand zwischen den Liganden zu erhalten, wenn der Abstand groß ist. Der einzig steuerbare Parameter ist der Funktionalisierungsgrad des Polymerrückgrats, was zu einer Variation der Abstände zwischen den Liganden führt. Synthetische Glycopeptide, bei denen ein helikales oder ein Random-Coil-Peptid an speziellen Aminosäuren mit einem Galactoserest versehen ist, wurden dafür genutzt, die Abstände zwischen den Liganden präzise zu steuern.^[117] Diese Glycopeptide wiesen in einem Verdrängungs-Assay mit CT eine bis zu 340-fache Steigerung der Inhibierung gegenüber Galactose auf. Ein optimaler Abstand von 35 Å zwischen Galactoseresten und eine helikale Konformation der Peptide hatten beide eine positive Wirkung auf die Hemmung. Kürzlich wurden divalente Random-Coil-Glycopeptide synthetisiert, um den Einfluss der Ladung des Peptidrückgrats auf die Bindung zu untersuchen.^[118] Wie wegen der Präsenz der basischen Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche, die die Kohlenhydrat-Bindungsstellen umgeben, erwartet, verbesserten negative Ladungen auf dem Rückgrat die Hemmung der Wechselwirkung zwischen CT und dessen Rezeptor.

Keines dieser Moleküle wurde in Zellkultur oder in vivo getestet; daher bleibt ihre therapeutische Wirksamkeit gegen CT oder LT unklar. Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, ist während einer Infektion eine Bindung und Inaktivierung von CT oder LT mit einem oralen Bindungsstoff äußerst anspruchsvoll. Die Bedeutung dieser Untersuchungen liegt vielmehr in den Kenntnissen, die bezüglich des multivalenten Designs von wirksamen Proteinbindungsstoffen gewonnen wurden.

Eine elegante Lösung für die kontrollierte Anordnung von Random-Coil-Polymeren besteht darin, ein Templat zu nutzen, um den Liganden in einer bestimmten Orientierung vorzuorganisieren. Die Serum-Amyloid-P-Komponente (SAP) ist ein pentameres Protein im Blut, das im Menschen den endogenen Neutralisierungsfaktor für Stx2 darstellt.^[119] Dieses Protein zirkuliert in Konzentrationen von ungefähr 30 mg L⁻¹, allerdings nur im Menschen. Tatsächlich waren Mäuse, die zweimal täglich Injektionen mit der menschlichen SAP erhielten, komplett geschützt gegen eine letale Dosis Stx2, aber nicht gegen Stx1.^[120] Transgene Mäuse, die menschliches SAP in ähnlich hohen Konzentrationen wie beim Menschen exprimieren, überlebten bei einer Stx2-Infektion viel länger als Wildtypmäuse, unterlagen der Krankheit aber letztlich doch. Die Autoren dieser Studie schlugen vor, dass die Verabreichung von SAP eine mögliche Therapie gegen HUS sein könnte. SAP selbst gilt wegen seines Vorkommens in Amyloidablagerungen als therapeutisches Zielmolekül. Eine niedermolekulare Verbindung, die SAP bindet und seine Anbindung an Amyloidfibrillen blockiert, wurde identifiziert.^[121] Die Dimerisierung dieses Moleküls ergab einen Liganden, der das pentavalente Protein in einer dimeren Sandwichstruktur anordnen konnte, die schnell über die Leber aus dem Blutkreislauf entfernt wurde. Ein ähnliches Konzept wurde dazu genutzt, eine Komplexbildung von SAP mit SLTs oder CT zu erzielen (Schema 4). Eine niedermole-

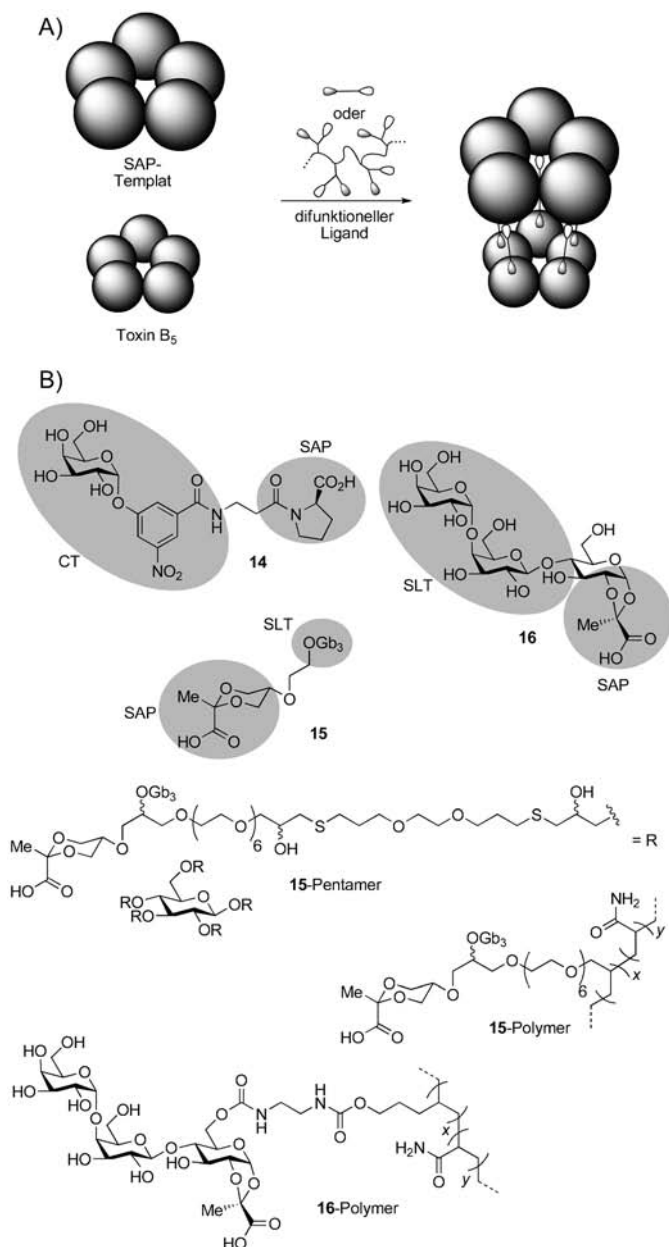
kulare Verbindung, die einen SAP-Liganden und MNPG kombinierte (**14**; Schema 4), hemmte die Anbindung von CT an seinen Rezeptor und (was noch wichtiger ist) steigerte in Gegenwart von SAP ihre Wirksamkeit um beinahe drei Größenordnungen.^[122] Ein ähnlicher Ligandentyp wurde auch für die Inhibierung von SLTs entworfen, mit Gb₃ als SLT-Ligand und einem Pyruvat-Ketal als SAP-Ligand (**15**; Schema 4).^[123] In diesem Fall wurde auch eine pentavalente Präsentation des difunktionellen Liganden **15** erforscht (**15**-Pentamer; Schema 4). Wie erwartet waren beide Liganden in einem ELISA-Test wirksam, wobei das Pentamer einen

niedrigeren IC₅₀-Wert aufwies und beide in der Gegenwart von SAP eine deutliche Verringerung des IC₅₀-Wertes zeigten. Die Wirkung von SAP für **15** (280-fach) war viel stärker als für das **15**-Pentamer (35-fach). Da das **15**-Pentamer bereits eine Pentamerstruktur aufweist, wird keine signifikant höhere Aktivität erwartet, die gewöhnlich durch das SAP-Templat entsteht.

Ein verbessertes Design difunktioneller Liganden führte zu **16**, bei dem Gb₃ und das Pyruvat-Ketal ohne drehbare Bindungen zwischen den beiden Liganden verbunden sind.^[124] Diese Veränderung führte in Gegenwart von SAP zu einer 50-fachen Verbesserung des IC₅₀-Werts mit einer um ungefähr vier Größenordnungen verbesserten Inhibierung. Erstaunlicherweise war diese niedermolekulare Verbindung in einem Vero-Zell-Zytotoxizitätstest so wirksam wie Starfish (Schema 2). Wegen seiner schnellen Ausscheidung über die Nieren war **16** im Mausmodell allerdings unwirksam. Acrylamidpolymere, die entweder mit **15** oder **16** funktionalisiert waren, zeigten eine stärkere Hemmung von Stx1 als der monomere Ligand und eine deutliche Verbesserung in Gegenwart von SAP (**15**-Polymer, **16**-Polymer; Schema 4).^[125] Interessanterweise ergab ein Polymer, das eine zufällige Anordnung von SAP-Ligand und Gb₃ aufwies, in Gegenwart von SAP keinerlei Verbesserung der Hemmung. Anders als monomeres **16** war das **16**-Polymer in transgenen Mäusen, die SAP exprimierten, wirksam. Das Polymer hat ein größeres hydrodynamisches Volumen und tritt wahrscheinlich als Komplex mit SAP auf, was seine erhöhte Zirkulationsdauer gegenüber jener von monomerem **16** erklären würde. Das Polymer konnte in einem Modell, bei dem Starfish den Todeszeitpunkt nur hinauszögern konnte, 100 % der Mäuse vor einem Stx1-induzierten Tod schützen. Mit Stx2 wurden keine In-vivo-Experimente durchgeführt, da es in Abwesenheit eines Liganden an menschliches SAP bindet. Das **16**-Polymer beeinflusste die Biodistribution von ¹²⁵I-Stx1, besonders indem es die Radioaktivitätsmenge in Nieren und Gehirn verminderte. Der größte Teil des Toxins schien in der Leber metabolisiert zu werden. Eine Klärung der genauen Rolle, die SAP im Zusammenhang mit menschlichen Infektionen spielt, ist bei der Beurteilung der klinischen Anwendung dieses Therapieansatzes ausschlaggebend.^[126]

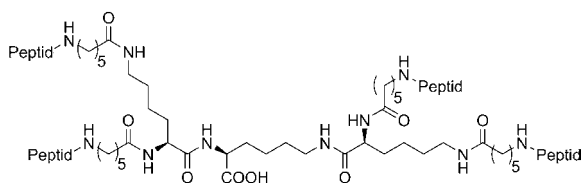
2.1.4. Multivalente Peptid-basierte Bindungsstoffe

Kohlenhydrate bieten eine offensichtliche Ausgangsbasis für das Design von Molekülen, die die Bindung von Toxinen an ihre Kohlenhydratrezeptoren hemmen sollen, haben allerdings auch Nachteile: Zum einen ist die Affinität des monovalenten Liganden für das Toxin fast immer gering, was eine Multivalenz erfordert, um bindende Moleküle mit hoher Affinität zu erhalten. Zum anderen ist es immer noch schwierig, einige der komplexeren Kohlenhydrate in großen Mengen zu synthetisieren. Eine Alternative besteht darin, Peptide zu nutzen, die Kohlenhydratpitopen ähneln. Darüber hinaus sind Peptide einfacher zu synthetisieren, und Peptidbibliotheken zum Screening lassen sich schnell durch Festphasensynthese aufbauen. Eine Bibliothek von tetravalenten Peptiden auf einem Lysinotrimer wurde auf ihre Wechselwirkung mit der B₅-Untereinheit von Stx2 unter-



Schema 4. A) Templatstrategie, bei der ein zirkulierendes, pentameres Protein genutzt wird, um einen monomeren oder polymeren difunktionellen Liganden so zu präorganisieren, dass eine effektive Bindung an die B₅-Untereinheit eines Toxins ermöglicht wird. B) Difunktionelle Liganden zur Hemmung von CT und SLT mit SAP-Templat.

sucht.^[127] Peptid **17** (Schema 5) schützte Mäuse, sogar im Falle einer intragastralen Verabreichung drei Tage nach der Infektion mit *E. coli* O157:H7. Überraschenderweise verhinderte das Peptid nicht die zelluläre Aufnahme des Toxins in den Golgi-Apparat, sondern störte den Transfer zum ER.



17, Peptid = Ac-MAPPPRRRRA-

Schema 5. Tetra-valente Präsentation des SLT bindenden Peptids.

Dieses System funktionierte in Mäusen nur intragastral und nicht intravenös.^[128] Bei Studien in einem Modell zur Blutvergiftung in nichthumanen Primaten, das einen dem menschlichen HUS ähnlicheren Krankheitsverlauf aufweist, rettete das tetra-valente Peptid **17** dennoch Paviane nach intravenöser Gabe vor einer andernfalls letalen Dosis Stx2.^[129] Wenn **17** in einer Konzentration von 5 mg kg^{-1} 24 h nach der Infektion mit Stx2 bis zum vierten Tag verabreicht wurde, gefolgt von einer täglichen Dosis von 1 mg kg^{-1} , dann überlebten drei von vier Pavianen und wiesen geschützte Nierenfunktionen und stabile Urinausscheidung auf. Dieses Modell ähnelt zwar humanem HUS, ist aber nicht perfekt und umfasst keine bakterielle Infektion. Weitere Forschungen in einem Infektionsmodell sind sicherlich von Interesse, um solch eine Therapie der klinischen Anwendung näher zu bringen.

Multivalente Peptide können auch als synthetischer Ersatz für wasserlösliche Kõderverbindungen genutzt werden (siehe Abschnitt 2.1.2), um eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen dem Toxin und seinem Rezeptor oder eine Zusammenlagerung des Toxins zu verhindern. Für Anthrax wurden multivalente Peptide eingesetzt, um Wechselwirkungen zwischen PA und Rezeptor sowie zwischen PA und LeF zu unterbinden. Eine Phagen-Display-Bibliothek wurde dafür genutzt, ein dodecameres Peptid zu identifizieren, das (wenngleich schwach) an PA₆₃ band und dessen Wechselwirkung mit LeF in geringem Ausmaß hemmte.^[130] Wenn dieses Peptid an ein Polyacrylamidrückgrat gebunden war, erbrachte die Multivalenz in einem Zytotoxizitätstest eine Herabsetzung des IC₅₀-Werts auf 20 nM, ein Abfall um fast vier Größenordnungen. Das Polymer schützte Ratten vor LeT, wenn es ihnen 3–4 min nach der Infektion injiziert wurde.

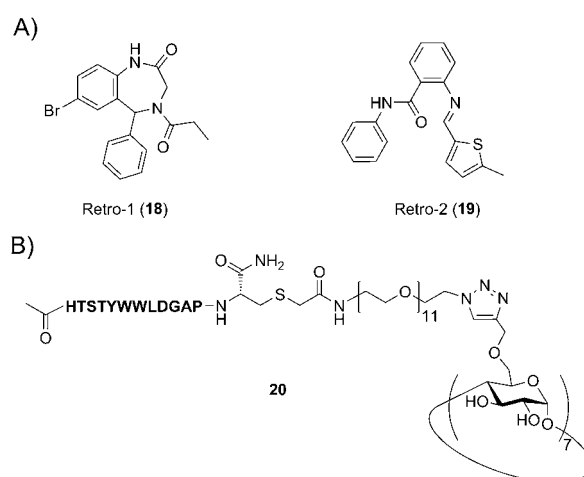
Mit einem ähnlichen Ansatz wurde ein Peptid identifiziert, das an die Rezeptoren TEM8 und CMG2 auf der Zelloberfläche bindet.^[131] Ein Phagen-Display-Selektionsexperiment führte zu einem Peptid, das die Assoziation zwischen beiden Rezeptoren und PA verhinderte. Multivalenz wurde dadurch erreicht, dass Liposomen mit mehreren Kopien des Peptids versehen wurden. Dieses Peptid sollte eigentlich auf Toxinrezeptoren abzielen und nicht auf das Toxin selbst. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Inhibition

an Zellen durch sterische Hemmung der LeF-Bindung an das heptamere PA₆₃ und nicht durch Blockieren der Wechselwirkung zwischen PA und Rezeptor erfolgte. Die Peptidbindungsstelle am Rezeptor überlappt vermutlich nicht mit der PA-Bindungsstelle, sodass die Bindung und Zusammenlagerung von PA₆₃ nicht gehemmt werden. Der Komplex ist dann nicht mehr dazu in der Lage, an LeF zu binden. Um die Diskrepanzen zwischen den Befunden und dem Phagen-Display zu erklären, mutmaßten die Autoren, dass die sterische Inhibition des Phagen die PA-Bindung gestört haben könnte. Dennoch bewahrte eine Koinjektion von LeT mit den Liposomen Ratten vor dem Tod.

2.2. Hemmung des Toxintransportsystems

Sobald die A-B-Toxine die Endozytose durchlaufen haben, erreichen sie das Zytosol über einen von zwei Wegen: entweder direkt aus dem Endosom (z.B. Anthrax-Toxin, Diphtherie-Toxin, TcdA, TcdB) oder aus dem ER nach retrogradem Transport ausgehend vom frühen Endosom über das TGN (z.B. CT, SLTs).^[132] Der zweite Transportweg scheint auf Toxinproteine beschränkt zu sein und bietet daher einen möglichen Angriffspunkt für Inhibitoren.

Die einzigen bekannten Moleküle, die den retrograden Toxintransport in vivo hemmen, sind Retro-1 und Retro-2 (**18** bzw. **19**; Schema 6A).^[133] Tatsächlich schützte die intraperitoneale (i.p.-)Injektion von Retro-2 in einer Dosis von nur 2 mg kg^{-1} Mäuse vor einer nasalen Infektion mit RT, die innerhalb von 21 Tagen tödlich für 90 % der Tiere war, wenn es eine Stunde vor dem Toxin verabreicht wurde. Zudem sind selbst so hohe Konzentrationen wie 400 mg kg^{-1} in Tieren nicht toxisch. Retro-1 und Retro-2 scheinen auf die zelluläre Transportmaschinerie und nicht auf Toxine zu wirken und haben somit auch das Potenzial, andere Toxine zu hemmen, die auf den retrograden Transport angewiesen sind. Die Autoren demonstrierten zudem, dass in frühen Endosomen die Relokalisierung des SNARE-Proteins Syntaxin 5 mit einer



Schema 6. A) Inhibitoren des retrograden Transportwegs, der z.B. von SLTs genutzt wird. B) β -Cyclodextrinderivat, das die EF- und LeF-Translokation durch die heptamere PA-Pore blockiert.

Blockierung von SLTs zusammenhängt. Ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus von Retro-1 und Retro-2 kann deren eigentlichen Wirkungsort aufdecken und die Möglichkeit eröffnen, sie weiter zu optimieren.

2.3. Hemmung der Toxintranslokation

Ein gemeinsames Merkmal von Toxinen des A-B-Typs ist ihre Fähigkeit, eine enzymatische Domäne in das Zytosol der Zielzelle zu transferieren. Die Translokation ist eine Abfolge von Konformationsänderungen des Toxins, die zu einer Verschiebung der katalytischen Domäne von der nichtzytosolischen zur zytosolischen Seite der Plasmamembran führt. Die Translokation von Toxinen, die in das Zytosol direkt ausgehend von den Endosomen eintreten, wird durch eine Ansäuerung der unmittelbaren Umgebung ausgelöst; davon unterscheidet sich die Translokation von Toxinen, die das Zytosol über einen retrograden Transport erreichen, der durch Chaperone und Translokatoren vermittelt wird.^[132] Eine indirekte Inhibierung von A-B-Toxinen, die eine Ansäuerung des Endosoms zur Translokation benötigen, kann durch die Gabe von Wirkstoffen erreicht werden, die eine endosomale Ansäuerung hemmen; dies ist jedoch wegen der möglichen Toxizitätsprobleme einer solchen Therapie keine praktikable Methode.^[134]

Die Translokation von EF und LeF aus Anthrax wurde detailliert untersucht, und es wurde eine Reihe von Wirkstoffkandidaten entwickelt, die den Translokationsprozess inhibieren und so die Pathogenese hemmen.^[135] Ein besonders erfolgreicher Ansatz besteht darin, die Translokation von EF und LeF dadurch zu inhibieren, dass der Porenkanal des heptamerisierten PA blockiert wird. Tatsächlich zeigen β -Cyclodextrinderivate mit einer siebenfachen Symmetrie, die der Symmetrie der PA-Pore entspricht, bei Milzbrandinfektionsmodellen in vivo Wirksamkeit.^[136] Die neueste Weiterentwicklung dieser Idee ist, cyclisches β -Cyclodextrin mit Peptiden, die spezifisch PA binden, über Polyethylenglycol-(PEG)-Linker zu funktionalisieren (**20**; Schema 6B).^[137] Die Autoren gaben für den heptavalenten peptidischen Inhibitor einen IC_{50} -Wert von ungefähr 10 nM an, was eine deutliche Verbesserung gegenüber dem Wert Amin-funktionalisierter β -Cyclodextrin-Derivative ist. In-vivo-Untersuchungen mit dem peptidischen Inhibitor belegten, dass er bei einer Koinjektion mit Toxin Ratten vor dem Tod durch Anthrax-Toxin bewahrte.

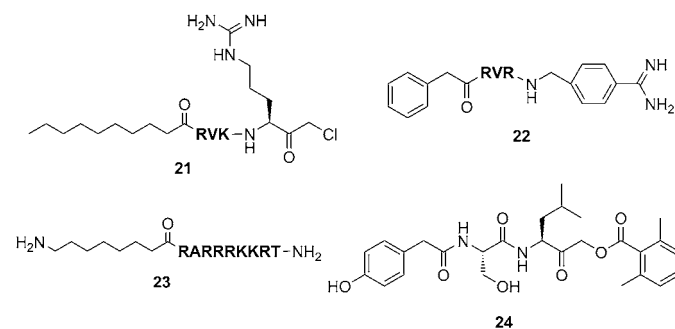
Außer Anthrax bilden A-B-Toxine keine stabilen Porenstrukturen, durch die die A-Einheit translozieren kann, was es unmöglich macht, sie auf analoge Weise als Zielorte zu adressieren. Allerdings erfordert eine Translokation über die ER-vermittelte Degradation einen Entfaltungsschritt, der als Angriffspunkt für Wirkstoffe genutzt werden kann. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass 4-Phenylbuttersäure das thermische Entfalten und damit auch die Translokation der A1-Untereinheit von CT verhindert.^[38b] Dieser Befund zeigt neue Möglichkeiten zur Inhibierung der Toxintranslokation auf.

2.4. Hemmung der Toxinprozessierung

2.4.1. Proprotein-Konvertase-Inhibitoren

Proprotein-Konvertasen (PCs) bilden eine neunköpfige Familie Ca^{2+} -abhängiger Serin-Endoproteasen, von denen sieben multibasische Motive als Zielstrukturen aufweisen (Furin, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6, PC7).^[138] Diese PCs kommen in Sekretions- und Endozytosewegen und an der Oberfläche von Säugetierzellen vor und sind daran beteiligt, Proteinvorstufen durch Spaltung an konservierten Erkennungssequenzen zu aktivieren (z.B. R-X-K/R-R↓-X).^[139] Furin, ein 96 kDa schweres Transmembran-Glycoprotein vom Typ I, wurde besonders detailliert untersucht, da es an zellulären Prozessen im Zusammenhang mit Wachstum, Homöostase und Krankheit beteiligt ist.^[140] Furine und andere PCs prozessieren Schlüsselmoleküle bei Krankheiten, von Alzheimer bis hin zu Krebs und viralen Infektionen, sowie Bakterieninfektionen. Wichtige Beispiele von Toxinen, die von PCs aktiviert werden, sind Anthrax-Toxin, SLTs und Diphtherie-Toxin (DT, *C. diphtheriae*). Eine kontrollierte Hemmung von Furin und anderen PCs wurde als ein möglicher Therapieansatz getestet, um das Fortschreiten der durch diese Toxine verursachten Krankheiten einzuschränken.^[141] Besonders das Anthrax-Toxin bildet einen vielversprechenden Ansatzpunkt für solch eine Therapie, da es von PCs an der Zelloberfläche (oder im extrazellulären Raum) prozessiert wird, im Unterschied zu SLTs und DT, deren Prozessierung intrazellulär erfolgt.^[71] Diese Methoden werden hier nur kurz angesprochen, da sie Toxine nur indirekt adressieren.

Die PC-Inhibitoren, die sich bisher als am vielversprechendsten herausgestellt haben, sind kurze Peptide (und ihre Analoga). Die Kristallstruktur von Furin, das kovalent an den potenten PC-Inhibitor Decanoyl-RVKR-Chlormethylketon (**21**; $K_i = 1$ nM; Schema 7) gebunden ist, hat viel zur Entwicklung neuer inhibierender Peptide beigetragen, indem sie die entscheidenden Merkmale des aktiven Zentrums offenbarte. Ein Ansatz, der sich als vielversprechend für die weitere Stabilitätsverbesserung von peptidischen Inhibitoren herausstellte, bestand darin, das P1-Arginin von **21** durch einen decarboxylierten peptidmimetischen Baustein wie 4-Amidinobenzylamid (**22**; $K_i = 0.8$ nM; Schema 7) zu ersetzen.^[143] Dies verringert die Anfälligkeit des Aminosäurerests für einen Abbau durch Carboxypeptidasen und führt zu einer



Schema 7. Niedermolekulare Inhibitoren der Autoprozessierung und PC-vermittelten Prozessierung von Toxinen.

engeren Bindung mit der aktiven Spalte des Zielenzyms. Der Verlust einer C-terminalen Ketogruppe macht das Molekül auch weniger anfällig für eine Racemisierung und einen nucleophilen Angriff.

Ein Vergleich der Aminosäurereste der katalytischen Spalte durch homologe Modellierung der sieben PCs ergab, dass die Untereinheiten S1 bis S5^[*] hoch konserviert sind.^[141a] Dies bedeutet, dass die Peptide mindestens sechs Aminosäuren lang sein müssen, um ein Mindestmaß an Selektivität zwischen PCs aufzuweisen. Aktuelle peptidische PC-Inhibitoren basieren auf einem erweiterten Spaltungsmotiv eines Virussubstrats, dem Hämagglutinin aus dem Vogelgrippeerreger H5N1.^[144] Das neun Aminosäuren lange RAR-RRKKRT-Peptid mit einer N-terminalen 8-Aminooctanoylgruppe (**23**; $K_i = 8$ nM; Schema 7) verminderte in geringen Konzentrationen (5 mg kg⁻¹ i.p.) die Todesfälle bei einem Lungenmilzbrandmodell in Mäusen. **23** wirkte nicht toxisch, womöglich weil es selektiv Furin inhibierte, was die endogene Prozessierung durch andere, für Homöostase benötigte PCs ermöglichte.

Alle therapeutischen Ansätze mit PC-Inhibitoren haben eine gemeinsame Hürde: die Bewältigung der funktionalen Redundanz der PC-Familie bei der Prozessierung von pathogenen und endogenen Substraten. Es bleibt auch abzuwarten, bis zu welchem Ausmaß die PC-Inhibition die Pathogenität von anderen Toxinen als Anthrax hemmen kann, beispielsweise von SLTs, bei denen die Zellgängigkeit des aktiven Moleküls für eine Inhibition notwendig ist.

2.4.2. Inhibitoren der Autoprozessierung

TcdA und TcdB aus *C. difficile* müssen prozessiert werden, um nach der Endozytose die enzymatische Domäne in das Zytosol freizusetzen; anstatt aber von PCs gespalten zu werden, spalten sich TcdA und TcdB beide selbst mithilfe ihrer eigenen CPD.^[21a] Eine ähnliche CPD wird auch im MARTX-Toxin aus *V. cholerae* gefunden.^[145] Ein Peptidderivat wurde kürzlich entwickelt, um kovalent die CPD von TcdB zu inhibieren (**24**; Schema 7).^[146] Die Aminosäuren des Dipeptids sind identisch zu jenen in den Positionen P1 und P2 der natürlichen CPD-Spaltungsstelle, und die Autoren fanden, dass die Wirkung der Inhibitoren bei Anbringen einer sperrigen hydrophoben Gruppe an den N-Terminus höher war als für den Fall einer kleineren Acetylgruppe. Interessanterweise waren Tripeptidinhibitoren weniger wirksam als Dipeptide. Molekulare Docking-Studien lassen auf minimale Wechselwirkungen zwischen dem Peptidrückgrat des Inhibitors und der CPD von TcdB schließen, was bedeutet, dass die Entwicklung von nichtpeptidischen Inhibitoren, die CPD auf ähnliche Art binden wie **24**, möglich ist. Unter Berücksichti-

gung der Ähnlichkeit von TcdB- und TcdA-Spaltungsstelle ist es denkbar, dass **24** auch die Selbstspaltung von TcdA hemmt.

Ein alternativer Ansatz zur Hemmung der Autoprozessierung von TcdA und TcdB besteht darin, eine S-Nitrosylierung des Cysteins im aktiven Zentrum der Toxine zu bewirken, einen Vorgang, der vermutlich einen endogenen Mechanismus zum Schutz des Wirts vor dem Toxin darstellt.^[147] Die S-Nitrosylierung von TcdB durch S-Nitroso-glutathion (GSNO), eine endogene Stickstoffmonoxidquelle, inhibiert die IP6-vermittelte Spaltung von TcdB in vitro. Die therapeutische Wirkung dieses Blockierungswegs wurde im CDI-Mausmodell bestätigt, bei dem orale Gabe von 10 mg kg⁻¹ GSNO die Überlebenswahrscheinlichkeit deutlich erhöhte. Die Verabreichung von GSNO in den Blinddarm und Koinjektion mit 0.25 mg kg⁻¹ IP6 verbesserten die Schutzwirkung noch einmal stark. Allerdings ist unklar, bis zu welchem Grad GSNO im GI-Trakt abgebaut wird oder in welchem Umfang es mit anderen Proteinen im GI-Trakt wechselwirkt.

Niedermolekulare Leitverbindungen zur Inaktivierung von TcdA und TcdB vor deren Internalisierung sind besonders vielversprechend, weil keine Membranpermeabilität nötig ist, da die Moleküle nur im Lumen des GI-Trakts wirksam sein müssen. Außerdem können hohe Konzentrationen der aktiven Verbindung im GI-Trakt erreicht werden.

2.5. Hemmung der Enzymaktivität von Toxinen

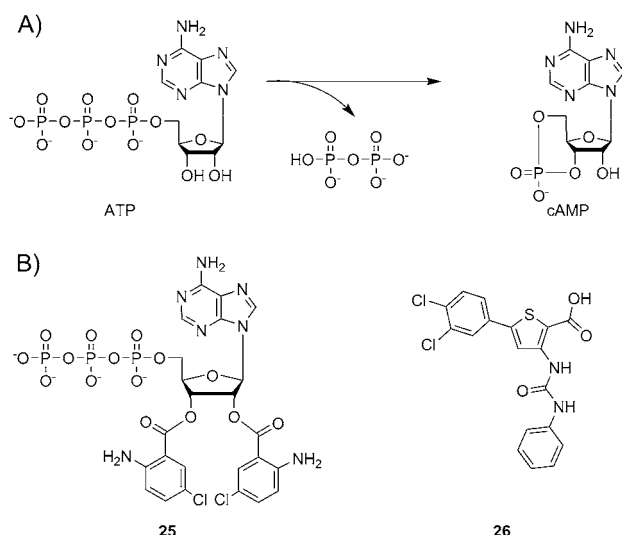
Ein weiterer Ansatz zur Inhibition von Bakterientoxinen ist es, den eigentlichen Auslöser der Zellerstörung als Angriffspunkt zu nutzen, d.h. den enzymatischen „Gefechtskopf“ der Toxine. Bakterielle Toxine können in Gruppen unterteilt werden, die den zellulären Zielmolekülen und/oder den Wirkmechanismen ihrer enzymatischen Domänen entsprechen. Dieser Abschnitt liefert keine vollständige Auflistung aller enzymatischen Domänen; Beispiele zu enzymatischen Sprengköpfen von Toxinen, die entweder keine wichtigen Virulenzfaktoren oder keine Toxine vom A-B-Typ sind (und sich daher außerhalb des Rahmens dieses Aufsatzes befinden), sind Phospholipasen, Desamidasen, Proteasen (außer Metalloproteasen) und Desoxyribonucleasen.^[1]

2.5.1. Adenylcyclase-Inhibitoren

Adenylcyclase(AC)-Toxine der Klasse II (auch Adenylatcyclase-Toxine genannt) umfassen EF- (*B. anthracis*) und Adenylatcyclase-Toxin (CyaA, *B. pertussis*).^[148] ACs katalysieren die Bildung von cAMP aus ATP (Schema 8A).^[149] Da cAMP ein wichtiger sekundärer Botenstoff ist, hat eine Erhöhung seiner Konzentration im Zytosol über das physiologische Niveau vielfältige potenziell schädliche Auswirkungen, wie erhöhte Ionenströme und Flüssigkeitssekretion, was Ödeme, Durchfall und eine Beeinträchtigung phagozytischer Funktionen bewirken kann.^[75, 150] Ca²⁺ und Calmodulin (CaM) modulieren die AC-Aktivität von EF und CyaA.^[151]

Die bisher entwickelten Inhibitoren der Enzymaktivität von AC-Toxinen hemmen entweder die Bindung des Substrats (ATP) an die aktive Bindungstasche (kompetitive

[*] Eine verbreitete Nomenklatur zur Beschreibung der Aminosäuresequenz in Peptiden relativ zur Spaltungsstelle von Proteasesubstraten kennzeichnet den Aminosäurerest am N-terminalen Ende der Spaltungsstelle als P1. Nachfolgende Aminosäurereste werden mit P2, P3, ... benannt; die Aminosäurereste am C-terminalen Ende der Spaltungsstelle werden mit P1', P2', ... gekennzeichnet. Die zugehörigen Proteasebindungsstellen werden mit S statt mit P bezeichnet.



Schema 8. A) Wirkmechanismus von Adenylcyclasen. B) Inhibitoren von Toxin-Adenylcyclasen.

Inhibitoren) oder die Aktivierung durch CaM (nichtkompetitive Inhibitoren).^[152] Die Kristallstruktur von EF mit und ohne CaM fand breite Anwendung für die Optimierung des Designs von EF-Inhibitoren, und die Strukturhomologie der AC-Domäne von EF mit CyaA lässt darauf schließen, dass Inhibitoren, die als Hemmer der AC-Bindungstasche von EF entwickelt wurden, wahrscheinlich auch CyaA inhibieren.^[69b,153]

Anthraniloyl-substituierte Nucleotide zeigen eine hemmende Aktivität gegen bakterielle ACs.^[154] Bis-Cl-ANT-ATP (**25**; Schema 8B) vereint eine sehr hohe Wirksamkeit ($K_i = 16$ nM) gegen CyaA mit 100- bis 150-fach geringerer Wirksamkeit gegen Säugetier-ACs.^[155] Eine Bissubstitution der Nucleotide ergibt eine wesentlich höhere Selektivität der Inhibitoren für CyaA gegenüber mACs als eine Monosubstitution, da sperrige Gruppen leichter in die größere CyaA-Substratbindungstasche eingepasst werden.

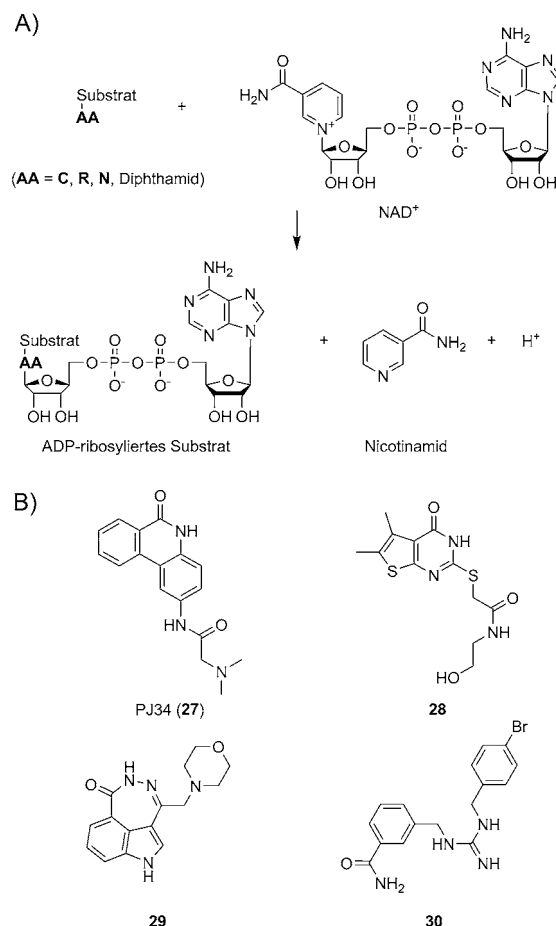
Thiophen-Uredoacil-Dichlorid (**26**; Schema 8B) ist ein anderer Wirkstoff, der, wie kürzlich gezeigt wurde, die Aktivierung von EF und CyaA durch CaM ($IC_{50} = 2$ μ M für EF) hemmt.^[152b] Ein Teil des Screening-Ansatzes zur Identifizierung dieser Verbindung bestand darin, einen plausiblen Mechanismus der Konformationsänderung zwischen dem inaktiven und dem CaM-aktivierten Zustand von EF zu entwickeln, um eine mögliche Bindungstasche zu identifizieren, die als Bindungsstelle für einen Inhibitor der CaM-Aktivierung wirken könnte. Inhibitoren für die Bindungstaschen statt für die ATP-Bindungsstelle der AC-Toxine haben den Vorteil, dass sie wahrscheinlich spezifischer und weniger toxisch als kompetitive Inhibitoren sind, wenn man bedenkt, dass ATP ein verbreitetes Substrat für eine Vielzahl von Enzymen ist.

Ein möglicher Grund für die fehlende In-vivo-Validierung der Inhibitoren von AC-Toxinen ist, dass sie immer mit anderen Toxinen zusammen sezerniert werden, die für die Virulenz wichtiger sein können. Im Fall vom Anthrax wirken in Mäusen beispielsweise nur sehr hohe ET-Konzentrationen tödlich (ca. 2 mg kg⁻¹), während LeT schon bei ca. 50 μ g kg⁻¹

letal ist.^[151c,156] Folglich dürften Inhibitoren von AC-Toxinen ein größeres Potenzial als Zusatzwirkstoffe denn als alleinige Wirkstoffe haben.

2.5.2. ADP-Ribosyltransferase-Inhibitoren

ADP-Ribosyltransferase(ADPRT)-Toxine bestehen aus einer Gruppe von ungefähr 20 Toxinen, die eine enzymatische Mono-ADP-Ribosyltransferase-Aktivität aufweisen, aber sonst nicht strukturell verwandt sind.^[157] ADPRT-Toxine binden NAD⁺, von dem die ADP-Ribose-Einheit auf ein Akzeptorprotein überführt wird (Schema 9A).^[158] DT



Schema 9. A) Wirkmechanismus von ADPRTs. B) Inhibitoren von Toxin-ADPRTs.

(*C. diphtheriae*), CT (*V. cholerae*), LT (*E. coli*), Exotoxin-A (*P. aeruginosa*) und Pertussis-Toxin (PT; *B. pertussis*) sind Beispiele für ADPRT-Toxine.^[159] ADP-Ribosylierung steuert zwar die Funktionen von vielen endogenen eukaryotischen Enzymen, allerdings zielen ADPRT-Toxine nur auf eine kleine Untergruppe von diesen ab: Actin und Mitglieder der G-Proteinfamilie, die heterotrimere G-Proteine (z.B. G_s und G_i), den eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF2) und Ras-Proteine (z.B. Rho-Familie der GTPasen) einschließen. DT, Exotoxin-A und Cholix-Toxin (*V. cholerae*) sind eine Untergruppe von ADPRT-Toxinen, die an ihrer gemeinsamen

Zielstruktur (eEF2) einen modifizierten Aminosäurerest (Diphthamid) ADP-ribosylieren, eine Eigenschaft, die dazu genutzt werden kann, die Inhibitorselektivität zu verbessern.^[160] ADPRT-Toxine können besonders zytotoxisch sein – so genügt ein einziges Molekül des DT-Fragments, das die ADPRT-Domäne enthält, um eine Zelle abzutöten.^[161] Obwohl die enzymatischen Domänen von ADPRT-Toxinen vielversprechende therapeutische Angriffspunkte sind, wurde bisher nur eine begrenzte Zahl von Leitstrukturen mit therapeutischem Potenzial identifiziert.

Die niedermolekulare Verbindung PJ34 (**27**; Schema 9B) ist ein unspezifischer kompetitiver Inhibitor der Exotoxin-A-ADPRT-Aktivität von *P. aeruginosa*.^[162] PJ34 hemmt Exotoxin-A wirksam ($K_i = 140$ nM) und ist auch ein Inhibitor von Säugetier-Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) in murinen Herzinfarktmodellen, wodurch ihm wahrscheinlich die Spezifität für ADPRT-Toxine fehlt, die für eine therapeutische Anwendung nötig sind. Die Kristallstruktur von Cholix-Toxin-gebundenem PJ34 wurde kürzlich als Vorlage für ein virtuelles Screening verwendet, um neue Inhibitoren gegen ADPRT-Toxine zu finden.^[160,163] Das Screening wurde mit einer großen Bibliothek Wirkstoff-ähnlicher kommerzieller Substanzen und mit einer viel kleineren Bibliothek bekannter PARP-Inhibitoren durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass zwei Verbindungen – **28** und **29** (Schema 9B) – in Zell-Assays eine hohe Wirksamkeit gegen Cholix-Toxin und ExoA mit einer geringen Toxizität vereinen. Sie könnten die Grundlage für das rationale Design von Inhibitoren mit verbesserter Bindungsaffinität bilden. Ein Bisubstratanalogon mit Benzamid- und Guanidineinheiten als Mimetika für die Substrate NAD^+ bzw. Arginin (**30**; Schema 9B) wies einen K_i -Wert von 8 μM gegen CT auf, aber es bleibt abzuwarten, wie sich diese Substanz in Zell-Assays verhält.^[164]

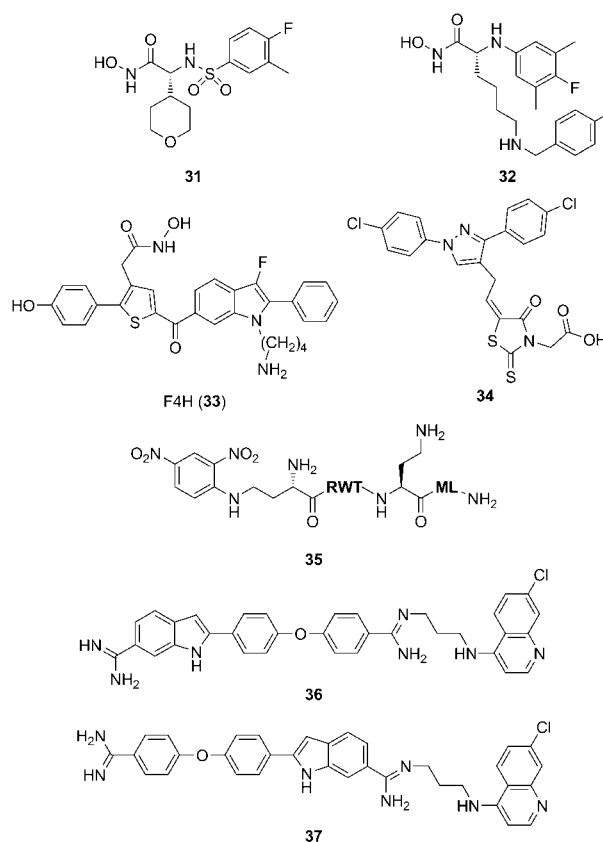
Es ist eine anspruchsvolle Aufgabe, spezifische Inhibitoren gegen die ADPRT-Domäne von Toxinen zu entwickeln, da sie – trotz ihrer eingeschränkten Sequenzidentität mit der von endogenen ADPRTs – ähnliche Strukturen in der NAD^+ -Bindungsstelle, dem so genannten Skorpionmotiv, aufweisen.^[165] Wahrscheinlich ist eine Wechselwirkung mit weniger konservierten Aminosäureresten jenseits des Skorpionmotivs notwendig, damit Moleküle zwischen endogenen ADPRTs und ADPRT-Toxinen unterscheiden können. Neue Fluoreszenz-Assays für das Hochdurchsatz-Screening von Leitstrukturen sollten zur Vergrößerung der derzeit begrenzten Zahl von ADPRT-Toxin-Inhibitoren beitragen.^[166]

2.5.3. Metalloprotease-Inhibitoren

Bakterien sezernieren vielfältige Zink-Metalloproteasen, aber nur wenige davon werden als Toxine des A-B-Typs klassifiziert (das Neurotoxin aus *Clostridium tetani* (TeNT) und die Neurotoxine aus *Clostridium botulinum* (BoNTs), LeT aus *Bacillus anthracis* und Fragilysin aus *Bacteroides fragilis*).^[1,167] Es ist bemerkenswert, dass die beiden wirksamsten der bekannten Bakterientoxine, die clostridialen Neurotoxine (CNTs) BoNT Serotyp A (BoNT/A) und TeNT, Metalloproteasen sind.^[156,168] Rekombinantes *B. anthracis*, das LeF mit einer katalytischen Punktmutation in der Metalloproteaseregion produziert, tötet Mäuse nicht, was darauf

schließen lässt, dass die Inhibierung der Metalloproteasen-aktivität ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von Milzbrand ist.^[169] Anthrax-LeT und -BoNTs (beides biologische Waffen der Kategorie A) sind diejenigen Metalloproteasetoxine, die in den letzten Jahren die populärsten Zielgruppen für die Inhibitorentwicklung bildeten; sie stehen im Mittelpunkt dieses Abschnitts.^[170] Metalloproteasetoxine weisen alle ein streng konserviertes, Zink bindendes HEXXH-Motiv auf, zeigen aber (außer im Falle von CNTs) keine ausgeprägte Sequenzhomologie jenseits dieses Motivs.^[167a,171] Tatsächlich sind die Sequenzen der CNTs BoNT/B und TeNT zu mehr als 50% identisch, und alle CNTs adressieren mit ähnlichen Mechanismen Proteine, die Teil des neuronalen SNARE-Komplexes sind, was letztlich die Freisetzung von Acetylcholin in der motorischen Endplatte hemmt.^[172] *C. botulinum* produziert sieben verschiedene Serotypen von BoNT (A–G), jedoch sind nur vier davon (A, B, E und F) im Menschen Erreger des Botulismus. Versuche, Inhibitoren gegen BoNTs zu entwickeln, konzentrieren sich hauptsächlich auf BoNT/A, da es am wirksamsten ist und es die längste Halbwertszeit für die Inhibierung der Neurotransmitter-Freisetzung aufweist ($t_{1/2} > 31$ Tage).^[173]

Moleküle, die eine Metall chelatisierende Hydroxamsäure enthalten, zeigten sich als besonders wirkungsvolle Inhibitoren der Metalloproteaseaktivität von BoNTs und LeF.^[170a,173a] Im Falle einer subkutanen Koinjektion mit Ciprofloxacin schützte das Sulfonamid-basierte Hydroxamat **31** (Schema 10) alle Kaninchen, die in einem so genannten „Punkt ohne Wiederkehr“-Modell getestet wurden, wogegen



Schema 10. Inhibitoren von Metalloproteasetoxinen.

Ciprofloxacin alleine nur 50 % der Kaninchen vor dem Tod bewahrte.^[4b] **31** bindet die LeF-Metalloproteasendomäne kompetitiv ($K_i = 24$ nM), wobei der Hydroxamsäurerest als zweizähliger Ligand an das Zinkion koordiniert.^[4b] Die Bindungstasche von LeF auf der S1'-Seite ist kleiner und enger als die der Matrix-Metalloproteasen und umschließt fest den aromatischen Molekülrest, was sie selektiv für LeF gegenüber Matrix-Metalloproteasen sowie einigen anderen endogenen Proteasen und Protease-ähnlichen Enzymen macht.^[174] Pharmakokinetische Parameter für **31** wurden auch in einigen präklinischen Studien bestimmt, deren Ergebnisse vermuten lassen, dass **31** sogar oral verabreicht werden könnte. In neuerer Zeit wurden Strukturmodifikationen von **31** getestet, die eine verbesserte Wirksamkeit in vivo ergeben.^[175] Eine Optimierung erbrachte Verbindung **32** (Schema 10) mit einem stark verbesserten K_i -Wert (0.24 nM), die nach einer LeT-Infektion in Konzentrationen von 2.5 mg kg^{-1} alle getesteten Ratten vor dem Tod bewahrte.^[175b]

Hydroxamate ergaben auch ermutigende Befunde in vivo als Inhibitoren der Metalloproteasenaktivität von BoNTs. Eine Computer-gestützte Optimierung mit einem „Kation-Dummy-Atom“ (CaDA)-Ansatz wurde zur Entwicklung von F4H verwendet, einem mikromolaren Inhibitor von BoNT/A (**33**; Schema 10).^[176] Eine i.p.-Vorbehandlung mit F4H 30 min vor der Toxin-Infizierung bewahrte sämtliche Mäuse 12 h nach der Infektion mit BoNT/A vor dem Tod, während im gleichen Zeitraum nur 40 % der unbehandelten Mäuse überlebten.^[176b] F4H hat eine relativ lange Halbwertszeit in Mäusen ($t_{1/2} = 6.5$ h). Es ist jedoch unklar, ob F4H die Mäuse vor BoNT/A schützt, indem es extrazelluläres Toxin bindet oder indem es direkt in betroffenen Neuronen auf das Toxin wirkt.^[176b] Es bleibt aber noch zu zeigen, in welchem Ausmaß F4H endogene Matrix-Metalloproteasen hemmen kann, auch wenn das Molekül keine akute Toxizität in vivo zu haben scheint.

Der Einsatz von Rhodaninderivaten als Inhibitoren von LeF und BoNT/A wurde ebenfalls schon untersucht.^[177] Ein Pyrazolderivat von Rhodanin (**34**; Schema 10) inhibierte in geringer mikromolarer Dosis kompetitiv BoNT/A und LeF und erhöhte bei einer Behandlung 24 h nach der Exposition die Überlebensrate von Mäusen, die mit Sterne-Sporen von *B. anthracis* infiziert waren. Anzumerken ist jedoch, dass Rhodanine wegen ihrer hohen Reaktivität mit Proteinen und Interferenz in photometrischen Assays ungewöhnlich häufig Treffer bei Hochdurchsatz-Screenings ergeben.^[178] Das Potenzial von Rhodaninen als therapeutische Moleküle muss daher durch strenge Selektivitäts- und Toxizitätstests überprüft werden.

Peptid-ähnliche Verbindungen, die analog zu Aminosäureresten rund um die leicht spaltbare Bindung des BoNT/A-Substrats (SNAP-25) entworfen wurden, inhibieren bakterielle Metalloproteasen in vitro (z. B. **35**; Schema 10).^[179] Die aus Strukturuntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse zur Konformation und den chemischen Kontakten mit der Zielstruktur können zur Datensuche in virtuellen Bibliotheken niedermolekularer Verbindungen genutzt werden, mit dem Ziel, Substanzen zu finden, die die Wirksamkeit der Peptid-ähnlichen Verbindungen mit den Wirkstoff-ähnlichen Qualitäten von nichtpeptidischen niedermolekularen Verbindun-

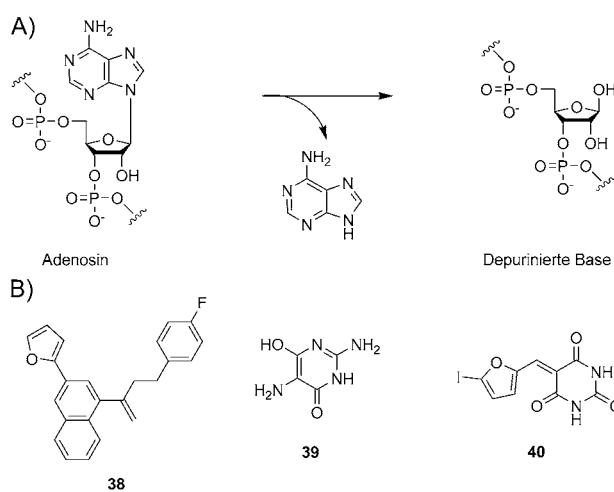
gen vereinen.^[4a] Ein Beispiel für eine entsprechende Optimierung von Leitstrukturen sind die Regioisomere **36** und **37** (Schema 10), die ersten nicht Zink koordinierenden, nicht-peptidischen, niedermolekularen Inhibitoren von BoNT/A, die in submikromolarer Dosis in vitro wirksam sind.^[180]

Eine systematische Untersuchung der Auswirkungen der Peptidlänge auf die hemmende Wirkung gegen BoNT/A hat kürzlich belegt, dass ein einfaches Tetrapeptid ausreicht, um kompetitiv BoNT/A mit hoher Wirksamkeit zu inhibieren.^[181] Das Tetrapeptid RRGK ($K_i = 158$ nM) ahmt die ersten vier Aminosäurereste des endogenen Substrats, QRATKM, nach und wirkt daher auf wirklich kompetitive Weise. Das Tetrapeptid verhielt sich spezifisch gegen BoNT/A und hemmte in mikromolaren Konzentrationen die BoNT/A-vermittelte Spaltung von SNAP-25 in mehreren Tests, die motorische Neuronen von Hühnern sowie primäre zerebrale Neuronen von Mäusen und Ratten verwendeten. Außerdem wies das etwa 500 Da schwere Tetrapeptid günstige Wirkstoff-ähnliche Merkmale auf, z. B. hohe Wasserlöslichkeit, Widerstandsfähigkeit gegen intrazelluläre Proteasen, gute Zellgängigkeit wegen seines kationischen Charakters und geringe Toxizität (bei $600 \mu\text{M}$), wodurch es zu einer vielversprechenden therapeutischen Leitstruktur wird.

2.5.4. RNA-N-Glycosidase-Inhibitoren

Shiga-Toxine und SLTs, die von *S. dysenteriae* bzw. *E. coli* produziert werden, sind die am häufigsten untersuchten Bakterientoxine mit einer RNA-N-Glycosidase-Aktivität.^[55,182] Sie sind Ribosom inhibierende Proteine (RIPs), die wirken, indem sie eine Adeningruppe in einer hoch konservierten Sequenz von 28S-ribosomaler RNA spalten, wodurch die Elongationsfaktor-1-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNA an Ribosomen und letztlich die Proteintranslation unterbunden werden (Schema 11 A).^[55,183] Der Wirkmechanismus ist dem der strukturell eng verwandten RTs sehr ähnlich.^[184]

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung von kompetitiven Inhibitoren der RNA-N-Glycosidasewirkung des Toxins be-



Schema 11. A) Wirkmechanismus von RNA-N-Glycosidasen. B) Inhibitoren von toxischen RNA-N-Glycosidasen.

steht darin, dass beim Nachempfinden des endogenen Substrats (Adenin) Moleküle entstehen, die nicht die für den therapeutischen Gebrauch geforderte Löslichkeit und Wirksamkeit aufweisen. Zudem ist das aktive Zentrum der RNA-N-Glycosidasetoxine sehr groß, was es zu einer schwierigen Zielstruktur für die Wirkstoff-Entwicklung macht.^[185] Eine neue Studie ergab, dass die bisher wirkungsvollsten Inhibitoren von Stx1A1 und RT in vitro (**38**; $IC_{50} \approx 30 \mu M$; Schema 11 B) in Zell-Assays nur moderat wirkten, was auf die schlechte Löslichkeit der Substanz zurückgeführt werden könnte.^[186] Dieses Molekül wirkt ähnlich wie **39** (Schema 11 B), ein anderer Inhibitor von Stx1A1 und RT, indem es mit der Zielstruktur wechselwirkt, wenn sich das Enzym in einem geschlossenen oder inaktiven Zustand befindet.^[187] Eine Bindung im geschlossenen Zustand bietet eine begrenztere Oberfläche für spezifische Wechselwirkungen als eine Bindung in der offenen Konformation, bei der Adenin endogen aufgenommen wird.^[185] Kürzlich wurde virtuelles Screening zur Untersuchung der Strukturunterschiede zwischen offenen und geschlossenen Konformationen von SLTs und RT genutzt, um neue Inhibitoren zu identifizieren, die anschließend in Zell-Assays untersucht wurden.^[185] Eine der wirksamsten identifizierten Substanzen, **40** ($IC_{50} \approx 200 \mu M$; Schema 11 B), hemmte RT in einem Zell-Assay, versagte aber beim Inhibieren von Stx1A1 und war in Konzentrationen über $30 \mu M$ zytotoxisch.

Die Autoren einer Studie, die einen ähnlichen Ansatz zur Validierung von Leitstrukturen nutzt, warnen, dass Luziferase-Assays, die manchmal für ein zellfreies Screening von Leitsubstanzen verwendet werden, falsch-positiv Ergebnisse liefern können, da die Strukturen von Leitsubstanz und D-Luciferin (dem Substrat der Firefly-Luziferase) einander ähneln.^[188] Die Entwicklung robusterer Hochdurchsatz-Screenings für Inhibitoren von RNA-N-Glycosidasetoxinen könnte dementsprechend zur Entdeckung neuer Leitsubstanzen beitragen. Bei der Maximierung der Inhibitor-Zielstruktur-Wechselwirkung zur Steigerung der Affinität einerseits und dem Erzielen eines Wirkstoff-ähnlichen niedermolekularen Inhibitors gegen RNA-N-Glycosidasetoxine andererseits muss man offensichtlich Kompromisse eingehen, aber die zuvor erwähnten Leitstrukturen bieten eine Grundlage für weitere Entwicklungen.

3. Zusammenfassung und Ausblick

Der Erfolg von Antibiotika bei der Behandlung bakterieller Infektionen ist unbestritten, allerdings werden wirksame Therapien durch eine gleichzeitige Zunahme von Antibiotikaresistenzen und eine sinkende Zahl neuer marktfähiger Medikamente erschwert. Außerdem sind Antibiotika nicht immer gegen Toxin produzierende Bakterien wie EHEC und *V. cholerae* wirksam. Seit dem Beginn der Verabreichung von Toxinantiserum und dem neueren Erfolg von Antikörpern und Impfungen ist der Nutzen von Therapien gegen Bakterientoxine längst anerkannt, und dank den mittlerweile gewonnenen Erkenntnissen über die Wirkmechanismen von Bakterientoxinen ist das Interesse an dem Gebiet wieder erwacht. Die Adressierung von Toxinen hat bereits bedeutende

Kenntnisse über die Wechselwirkungen von Molekülen mit Proteinen, besonders hinsichtlich der Multivalenz, erbracht. Allerdings gilt es noch einige Hürden zu überwinden, wenn einige dieser Strategien zu Therapien weiterentwickelt werden sollen.

Bei der Entwicklung neuer Moleküle für therapeutische Zwecke werden die Aspekte des Wirkstoff-Transports, wie Permeabilität, Löslichkeit und Eliminierung, in der akademischen Forschung zu oft ignoriert. Der fehlende Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit in vitro und in vivo, der oft bei Bakterientoxin bindenden Stoffen beobachtet wird, lässt darauf schließen, dass das Schicksal der Wirkstoff-Toxin-Komplexe in die Überlegungen mit einbezogen werden muss. Zum Beispiel könnte ein gezieltes Angreifen von Clearance-Wegen, wie den makrophagischen Scavenger-Rezeptoren, eine interessante Forschungsrichtung sein. Im Falle von Molekülen, die Toxine im GI-Trakt binden sollen, spielt die Ausscheidung keine Rolle, aber die harsche Umgebung und die physikalische Barriere der schützenden Schleimschicht um die Enterozyten sollten bei der Wirkstoff-Entwicklung früh berücksichtigt werden.

Einige Enzymklassen sind von Natur aus schwierige Zielstrukturen. Zum Beispiel sind die Glucosyltransferasedomänen von *C. difficile*-TcdA und -TcdB zwar interessante Zielstrukturen, allerdings ist die Entwicklung von Inhibitoren schwierig, da das Imitieren der UDP-Glucose-Substrate Moleküle mit schlechten Wirkstoff-ähnlichen Merkmalen liefert. Dementsprechend könnte eine Lösung des allgemeinen Problems der Entwicklung von Glucosyltransferase-Inhibitoren zu neuen Wirkstoffen gegen TcdA und TcdB führen. Der Einsatz von Peptiden, die an das aktive Zentrum binden, könnte den Durchbruch auf diesem Gebiet bringen.^[189] Ganz ähnlich sind RNA-N-Glycosidasen vielversprechende, aber schwierige Zielverbindungen. Im Falle der ADPRT-Toxine besteht die größte Schwierigkeit darin, eine Selektivität für die Toxine gegenüber endogenen ADPRTs zu erreichen. Die weitere Verbesserung des Durchsatzes sowie eine Verringerung der Zahl falsch-positiver Befunde bei Enzym-Assays für das Inhibitor-Screening sind entscheidend für die Entdeckung potenter Inhibitoren enzymatischer Toxinkomponenten.

Wie wir in diesem Aufsatz immer wieder angedeutet haben, sind zudem nicht alle Toxine klinisch relevante Zielstrukturen. Zum Beispiel ist EF aus *B. anthracis* als Ursache von Krankheitssymptomen und Tod wahrscheinlich weniger wichtig als LeF. Ebenso wissen wir nun, dass TcdB aus *C. difficile* nicht ignoriert werden kann, da es bei der Pathologie mindestens genauso wichtig ist wie TcdA. Der sozio-ökonomische Zusammenhang der Krankheit muss ebenfalls in die Überlegungen mit einbezogen werden. Auch wenn die Wissenschaft idealerweise frei von solchen Zwängen sein sollte, ist klar, dass eine komplexe und teure Cholera-therapie angesichts einfacherer und billigerer Alternativen wie einer Rehydrierungstherapie wahrscheinlich kaum großen Erfolg haben wird. Analog sind komplizierte Synthesen ein erhebliches Hindernis bei der kommerziellen Entwicklung von komplexen Makromolekülen, selbst bei Krankheiten, von denen Industrieländer betroffen sind.

Die Tatsache, dass in letzter Zeit eine Reihe von Misserfolgen bei fortgeschrittenen Wirkstoff-Kandidaten zu verzeichnen war, zeigt, dass es ebenfalls immens wichtig ist, bei der Therapieplanung den Zeitpunkt und den Ort der Toxin-freisetzung zu berücksichtigen. Zum Beispiel ist die Therapie gegen SLTs bei HUS teilweise deshalb schwierig, weil das therapeutisch mögliche Fenster sehr klein ist.

Wir erwarten, dass neue mechanistische Einblicke in die Wirkweise der Toxine den Zugang zu neuen und wirkungsvolleren Therapien eröffnen werden. Zum Beispiel könnte eine Identifizierung der Rezeptoren für TcdA und TcdB aus *C. difficile* nützliche Informationen für das Inhibitor-Design liefern. Chemiker können hier durch die Entwicklung chemischer Hilfsmittel zu neuen Erkenntnissen beitragen und dieses Wissen nutzen, um innovative Strategien gegen diese Krankheiten zu entwerfen. Die enorme Zahl der bakteriellen Toxine, zusammen mit unseren vertieften Kenntnissen ihrer Pathogenese, sollte ein fruchtbares Feld für die zukünftige akademische Forschung zur Verfügung stellen.

Abkürzungen

AC	Adenylylcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
ADPRT	ADP-Ribosyltransferase
BoNT	Botulinum-Neurotoxin
CaM	Calmodulin
CDI	<i>C. difficile</i> -Infektion
CDT	<i>C. difficile</i> -Transferase
CMG2	Capillary Morphogenesis Protein 2
CNT	clostridiales Neurotoxin
CPD	Cysteinprotease-domäne
CT	Cholera-Toxin
CyaA	Adenylatcyclase-Toxin
DT	Diphtherie-Toxin
eEF2	eukaryotischer Elongationsfaktor 2
EF	Edema Factor
EHEC	enterohämorrhagisches <i>E. coli</i>
ET	Edema Toxin
ETEC	enterotoxigenes <i>E. coli</i>
GI	gastrointestinal
GT	Glucosyltransferase
HUS	hämolytisches urämisches Syndrom
i.p.	intraperitoneal
LeF	letal Faktor
LeT	letales Toxin
LT	hitelabiles Toxin
MKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MNPG	<i>m</i> -Nitrophenyl- α -D-galactosid
PA	protektives Antigen
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PC	Proprotein-Konvertase
RT	Ricin-Toxin
SAP	Serum-Amyloid-P-Komponente
SLT	Shiga-ähnliches Toxin
SLT	Shiga-Toxin
TcdA	<i>C. difficile</i> -Toxin A
TcdA	<i>C. difficile</i> -Toxin B

TEM8	Tumor Endothelial Marker 8
TeNT	Tetanus-Neurotoxin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk

Dies Arbeit wurde mit einem ETH-Forschungsstipendium unterstützt (ETH-08 10-3).

Eingegangen am 24. Juni 2011,
veränderte Fassung am 21. September 2011
Online veröffentlicht am 22. März 2012
Übersetzt von Dr. Annette Kraus, Stockholm

- [1] J. E. Alouf in *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 3. Aufl. (Hrsg.: E. A. Joseph, R. P. Michel), Academic Press, London, **2006**, S. 3–21.
- [2] a) L. Cegelski, G. R. Marshall, G. R. Eldridge, S. J. Hultgren, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 17–27; b) A. E. Clatworthy, E. Pierson, D. T. Hung, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 541–548.
- [3] D. A. Rasko, V. Sperandio, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 117–128.
- [4] a) J. C. Burnett, G. Ruthel, C. M. Stegmann, R. G. Panchal, T. L. Nguyen, A. R. Hermone, R. G. Stafford, D. J. Lane, T. A. Kenny, C. F. McGrath, P. Wipf, A. M. Stahl, J. J. Schmidt, R. Gussio, A. T. Brunger, S. Bavari, *J. Biol. Chem.* **2006**, *282*, 5004–5014; b) W. L. Shoop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7958–7963.
- [5] G. Schiavo, F. G. van der Goot, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 530–537.
- [6] C. Denève, C. Janoir, I. Poilane, C. Fantinato, A. Collignon, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *33*, S24–S28.
- [7] M. Rupnik, M. H. Wilcox, D. N. Gerding, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 526–536.
- [8] D. N. Gerding, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2010**, *31*, S32–S34.
- [9] L. C. McDonald, G. E. Killgore, A. Thompson, R. C. Owens, S. V. Kazakova, S. P. Sambol, S. Johnson, D. N. Gerding, *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 2433–2441.
- [10] a) J. Pepin, *Can. Med. Assoc. J.* **2004**, *171*, 466–472; b) J. G. Bartlett, *Ann. Intern. Med.* **2006**, *145*, 758–764.
- [11] N. M. Sullivan, S. Pellett, T. D. Wilkins, *Infect. Immun.* **1982**, *35*, 1032–1040.
- [12] C. Schwan, B. Stecher, T. Tzivelekidis, M. van Ham, M. Rohde, W.-D. Hardt, J. Wehland, K. Aktories, S. R. Blanke, *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000626.
- [13] J. T. Barbieri, M. J. Riese, K. Aktories, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2002**, *18*, 315–344.
- [14] D. E. Voth, J. D. Ballard, *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 247–263.
- [15] a) D. Lyras, J. R. O'Connor, P. M. Howarth, S. P. Sambol, G. P. Carter, T. Phumoonna, R. Poon, V. Adams, G. Vedantam, S. Johnson, D. N. Gerding, J. I. Rood, *Nature* **2009**, *458*, 1176–1179; b) S. A. Kuehne, S. T. Cartman, J. T. Heap, M. L. Kelly, A. Cockayne, N. P. Minton, *Nature* **2010**, *467*, 711–713.
- [16] T. Jank, K. Aktories, *Trends Microbiol.* **2008**, *16*, 222–229.
- [17] S. J. Demarest, J. Salbato, M. Elia, J. Zhong, T. Morrow, T. Holland, K. Kline, G. Woodnutt, B. E. Kimmel, G. Hansen, *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 1197–1206.
- [18] X. Na, H. Kim, M. P. Moyer, C. Pothoulakis, J. T. LaMont, *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 2862–2871.
- [19] G. F. Clark, H. C. Krivan, T. D. Wilkins, D. F. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *257*, 217–229.
- [20] R. N. Pruitt, M. G. Chambers, K. K. S. Ng, M. D. Ohi, D. B. Lacy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 13467–13472.
- [21] a) M. Egerer, K. J. Satchell, *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000942; b) R. N. Pruitt, B. Chagot, M. Cover, W. J. Chazin, B. Spiller,

- D. B. Lacy, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 21934–21940; c) J. Reineke, S. Tenzer, M. Rupnik, A. Koschinski, O. Hasselmayer, A. Schrattenholz, H. Schild, C. von Eichel-Streiber, *Nature* **2007**, *446*, 415–419.
- [22] S. S. Ghantaji, K. Sail, D. R. Lairson, H. L. DuPont, K. W. Garey, *J. Hosp. Infect.* **2010**, *74*, 309–318.
- [23] a) S. Aslam, R. Hamill, D. Musher, *Lancet Infect. Dis.* **2005**, *5*, 549–557; b) S. H. Cohen, D. N. Gerding, S. Johnson, C. P. Kelly, V. G. Loo, L. C. McDonald, J. Pepin, M. H. Wilcox, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2010**, *31*, 431–455.
- [24] a) T. Louie, M. Miller, C. Donskey, K. Mullane, E. J. C. Goldstein, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *53*, 223–228; b) T. J. Louie, M. A. Miller, K. M. Mullane, K. Weiss, A. Lentnek, Y. Golan, S. Gorbach, P. Sears, Y.-K. Shue, *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 422–431.
- [25] E. Dolgin, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 10–10.
- [26] J. Pepin, L. Valiquette, B. Cossette, *Can. Med. Assoc. J.* **2005**, *173*, 1037–1042.
- [27] S. P. Sambol, M. M. Merrigan, J. K. Tang, S. Johnson, D. N. Gerding, *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1781–1789.
- [28] I. Lowy, D. C. Molrine, B. A. Leav, B. M. Blair, R. Baxter, D. N. Gerding, G. Nichol, W. D. Thomas, Jr., M. Leney, S. Sloan, C. A. Hay, D. M. Ambrosino, *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 197–205.
- [29] a) S. Aboudola, K. L. Kotloff, L. Kyne, M. Warny, E. C. Kelly, S. Sougioultzis, P. J. Giannasca, T. P. Monath, C. P. Kelly, *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 1608–1610; b) D. C. Kaslow, J. W. Shiver, *Annu. Rev. Med.* **2011**, *62*, 201–215.
- [30] D. Sack, R. Sack, G. Nair, A. Siddique, *Lancet* **2004**, *363*, 223–233.
- [31] J. N. Zuckerman, L. Rombo, A. Fisch, *Lancet Infect. Dis.* **2007**, *7*, 521–530.
- [32] a) J. S. Zhang, F. Liu, L. Huang, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 689–698; b) L. d. Haan, T. R. Hirst, *Mol. Membr. Biol.* **2004**, *21*, 77–92.
- [33] J. Sánchez, J. Holmgren, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1347–1360.
- [34] R. G. Zhang, D. L. Scott, M. L. Westbrook, S. Nance, B. D. Spangler, G. G. Shipley, E. M. Westbrook, *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 563–573.
- [35] E. A. Merritt, P. Kuhn, S. Sarfaty, J. L. Erbe, R. K. Holmes, W. G. J. Hol, *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 1043–1059.
- [36] a) J. Holmgren, I. Lonnroth, J. Mansson, L. Svennerholm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 2520–2524; b) J. Holmgren, I. Lonnroth, L. Svennerholm, *Infect. Immun.* **1973**, *8*, 208–214.
- [37] Y. Feng, A. P. Jadhav, C. Rodighiero, Y. Fujinaga, T. Kirchhausen, W. I. Lencer, *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 596–601.
- [38] a) K. Teter, R. K. Holmes, *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 6172–6179; b) M. Taylor, T. Banerjee, F. Navarro-Garcia, J. Huerta, S. Massey, M. Burlingame, A. H. Pande, S. A. Tatulian, K. Teter, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18825.
- [39] R. M. López-Gigosos, E. Plaza, R. M. Díez-Díaz, M. J. Calvo, *J. Glob. Infect. Dis.* **2011**, *3*, 56–62.
- [40] K. Hirai, H. Arimitsu, K. Umeda, K. Yokota, L. Shen, K. Ayada, Y. Kodama, T. Tsuji, Y. Hirai, K. Oguma, *Acta Med. Okayama* **2010**, *64*, 163–170.
- [41] M. A. Croxen, B. B. Finlay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *8*, 26–38.
- [42] M. Bielaszewska, A. Mellmann, W. Zhang, R. Köck, A. Fruth, A. Bauwens, G. Peters, H. Karch, *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11*, 671–676.
- [43] M. Bitzan, *Kidney Int.* **2009**, *75*, S62–S66.
- [44] C. S. Wong, S. Jelacic, R. L. Habeeb, S. L. Watkins, P. I. Tarr, *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 1930–1936.
- [45] X. Zhang, A. D. McDaniel, L. E. Wolf, G. T. Keusch, M. K. Waldor, D. W. Acheson, *J. Infect. Dis.* **2000**, *181*, 664–670.
- [46] P. Tarr, C. Gordon, W. Chandler, *Lancet* **2005**, *365*, 1073–1086.
- [47] a) D. Orth, A. B. Khan, A. Naim, K. Grif, J. Brockmeyer, H. Karch, M. Joannidis, S. J. Clark, A. J. Day, S. Fidanzi, H. Stoiber, M. P. Dierich, L. B. Zimmerhackl, R. Wurzn, *J. Immunol.* **2009**, *182*, 6394–6400; b) A. L. Lapeyraqe, M. Malina, V. Fremeaux-Bacchi, T. Boppel, M. Kirschfink, M. Oualha, F. Proulx, M. J. Clermont, F. Le Deist, P. Niaudet, F. Schaefer, *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2561–2563.
- [48] M. E. Fraser, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27511–27517.
- [49] M. Jacewicz, H. Clausen, E. Nudelman, A. Donohue-Rolfe, G. T. Keusch, *J. Exp. Med.* **1986**, *163*, 1391–1404.
- [50] K. Sandvig, B. van Deurs, *EMBO J.* **2000**, *19*, 5943–5950.
- [51] K. Sandvig, O. Garred, K. Prydz, J. V. Kozlov, S. H. Hansen, B. Vandeurs, *Nature* **1992**, *358*, 510–512.
- [52] O. Garred, B. van Deurs, K. Sandvig, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10817–10821.
- [53] M. Yu, D. B. Haslam, *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 2524–2532.
- [54] Y. Endo, K. Mitsui, M. Motizuki, K. Tsurugi, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5908–5912.
- [55] Y. Endo, K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara, K. Igarashi, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *171*, 45–50.
- [56] A. W. Paton, J. C. Paton, *Toxins* **2010**, *2*, 215–228.
- [57] H. Ling, A. Boodhoo, B. Hazes, M. D. Cummings, G. D. Armstrong, J. L. Brunton, R. J. Read, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1777–1788.
- [58] P. Boerlin, S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J. B. Wilson, R. P. Johnson, C. L. Gyles, *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 497–503.
- [59] A. M. Solyk, C. R. MacKenzie, V. M. Wolski, T. Hiram, P. I. Kitov, D. R. Bundle, J. L. Brunton, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5351–5359.
- [60] H. Shimizu, R. A. Field, S. W. Homans, A. Donohue-Rolfe, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11078–11082.
- [61] M. J. Flagler, S. S. Mahajan, A. A. Kulkarni, S. S. Iyer, A. A. Weiss, *Biochemistry* **2010**, *49*, 1649–1657.
- [62] T. N. Ellis, M. J. Kuehn, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 81–94.
- [63] A. S. Sheoran, S. Chapman-Bonofiglio, B. R. Harvey, J. Mukherjee, G. Georgiou, A. Donohue-Rolfe, S. Tzipori, *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 4607–4613.
- [64] a) T. C. Dowling, P. A. Chavaillaz, D. G. Young, A. Melton-Celsa, A. O'Brien, C. Thuning-Roberson, R. Edelman, C. O. Tacket, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1808–1812; b) E. L. Lopez, M. M. Contrini, E. Glatstein, S. Gonzalez Ayala, R. Santoro, D. Allende, G. Ezcurra, E. Teplitz, T. Koyama, Y. Matsumoto, H. Sato, K. Sakai, S. Hoshida, K. Komoriya, T. Morita, R. Harning, S. Brookman, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 239–243.
- [65] J. A. T. Young, R. J. Collier, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 243–265.
- [66] M. Mock, A. Fouet, *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 647–671.
- [67] T. V. Inglesby, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2002**, *287*, 2236–2252.
- [68] N. S. Duesbery, *Science* **1998**, *280*, 734–737.
- [69] a) S. H. Leppla, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3162–3166; b) C. L. Drum, S.-Z. Yan, J. Bard, Y.-Q. Shen, D. Lu, S. Soelaiman, Z. Grabarek, A. Bohm, W.-J. Tang, *Nature* **2002**, *415*, 396–402.
- [70] G. van der Goot, J. A. T. Young, *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 406–412.
- [71] A. M. Buckle, K. Gawlik, A. G. Remacle, S. A. Shiryaev, V. S. Golubkov, M. Ouyang, Y. Wang, A. Y. Strongin, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11305.
- [72] A. G. Remacle, S. A. Shiryaev, E. S. Oh, P. Cieplak, A. Srinivasan, G. Wei, R. C. Liddington, B. I. Ratnikov, A. Parent, R. Desjardins, R. Day, J. W. Smith, M. Lebl, A. Y. Strongin, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 20897–20906.
- [73] L. Abrami, M. Bischofberger, B. Kunz, R. Groux, F. G. van der Goot, J. A. T. Young, *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000792.
- [74] M. Moayeri, *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 670–682.

- [75] S. H. Leppla in *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 3. Aufl. (Hrsg.: E. A. Joseph, R. P. Michel), Academic Press, London, **2006**, S. 323–347.
- [76] D. B. Lacy, D. J. Wigelsworth, R. A. Melnyk, S. C. Harrison, R. J. Collier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13147–13151.
- [77] Z. Chen, M. Moayeri, H. Zhao, D. Crown, S. H. Leppla, R. H. Purcell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13487–13492.
- [78] T.-S. Migone, G. M. Subramanian, J. Zhong, L. M. Healey, A. Corey, M. Devalaraja, L. Lo, S. Ullrich, J. Zimmerman, A. Chen, M. Lewis, G. Meister, K. Gillum, D. Sanford, J. Mott, S. D. Bolmer, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 135–144.
- [79] S. Sharma, D. Thomas, J. Marlett, M. Manchester, J. A. T. Young, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1210–1212.
- [80] a) D. B. Jernigan, P. L. Raghunathan, B. P. Bell, R. Brechner, E. A. Bresnitz, J. C. Butler, M. Cetron, M. Cohen, T. Doyle, M. Fischer, C. Green, K. S. Griffith, J. Guarnier, J. L. Hadler, J. A. Hayslett, R. Meyer, L. R. Petersen, M. Phillips, R. Pinner, T. Popovic, C. P. Quinn, J. Reefhuis, D. Reissman, N. Rosenstein, A. Schuchat, W. Shieh, L. Siegal, D. L. Swerdlow, F. C. Tenover, M. Traeger, J. W. Ward, I. Weisfuse, S. Wiersma, K. Yeskey, S. Zaki, D. A. Ashford, B. A. Perkins, S. Ostroff, J. Hughes, D. Fleming, J. P. Koplan, J. L. Gerberding, National Anthrax Epidemiologic Investigation Team, *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 1019–1028; b) F. A. Abramova, L. M. Grinberg, O. V. Yampolskaya, D. H. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2291–2294.
- [81] a) H. Trachtman, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2003**, *290*, 1337–1344; b) K. Weiss, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *33*, 4–7.
- [82] G. D. Armstrong, E. Fodor, R. Vanmaele, *J. Infect. Dis.* **1991**, *164*, 1160–1167.
- [83] L. D. Heerze, M. A. Kelm, J. A. Talbot, G. D. Armstrong, *J. Infect. Dis.* **1994**, *169*, 1291–1296.
- [84] I. Castagliuolo, J. T. LaMont, B. Qiu, S. T. Nikulasson, C. Pothoulakis, *Gastroenterology* **1996**, *111*, 433–438.
- [85] T. Dingle, S. Wee, G. L. Mulvey, A. Greco, E. N. Kitova, J. Sun, S. Lin, J. S. Klassen, M. M. Palcic, K. K. S. Ng, G. D. Armstrong, *Glycobiology* **2008**, *18*, 698–706.
- [86] a) R. A. Cone, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 75–85; b) S. K. Lai, Y.-Y. Wang, J. Hanes, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 158–171.
- [87] L. S. Simpson, L. Burdine, A. K. Dutta, A. P. Feranchak, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5760–5762.
- [88] H. M. Scobie, D. Thomas, J. M. Marlett, G. Destito, D. J. Wigelsworth, R. J. Collier, J. A. Young, M. Manchester, *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 1047–1051.
- [89] C. Cai, J. Che, L. Xu, Q. Guo, Y. Kong, L. Fu, J. Xu, Y. Cheng, W. Chen, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20646.
- [90] K. L. Wycoff, A. Belle, D. Deppe, L. Schaefer, J. M. Maclean, S. Haase, A. K. Trilling, S. Liu, S. H. Leppla, I. N. Geren, J. Pawlik, J. W. Peterson, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 132–139.
- [91] a) K. L. Kiick, *Science* **2007**, *317*, 1182–1183; b) N. Bertrand, M. A. Gauthier, C. Bouvet, P. Moreau, A. Petitjean, J.-C. Leroux, J. Leblond, *J. Controlled Release* **2011**, *155*, 200–210.
- [92] P. K. Dhal, S. R. Holmes-Farley, C. C. Huval, T. H. Jozefiak, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *192*, 9–58.
- [93] M. Pinier, E. F. Verdu, M. Nasser-Eddine, C. S. David, A. Vezina, N. Rivard, J. C. Leroux, *Gastroenterology* **2009**, *136*, 288–298.
- [94] C. B. Kurtz, E. P. Cannon, A. Brezzani, M. Pitruzzello, C. Dinardo, E. Rinard, D. W. K. Acheson, R. Fitzpatrick, P. Kelly, K. Shackett, A. T. Papoulis, P. J. Goddard, R. H. Barker, G. P. Palace, J. D. Klinger, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2340–2347.
- [95] W. Braunlin, Q. W. Xu, P. Hook, R. Fitzpatrick, J. D. Klinger, R. Burrier, C. B. Kurtz, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 534–539.
- [96] R. Roy, F. D. Tropper, A. Romanowska, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 256–261.
- [97] a) M. Watanabe, K. Matsuoka, E. Kita, K. Igai, N. Higashi, A. Miyagawa, T. Watanabe, R. Yanoshita, Y. Samejima, D. Terunuma, Y. Natori, K. Nishikawa, *J. Infect. Dis.* **2004**, *189*, 360–368; b) J. M. Gargano, T. Ngo, J. Y. Kim, D. W. K. Acheson, W. J. Lees, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12909–12910.
- [98] H. Dohi, Y. Nishida, M. Mizuno, M. Shinkai, T. Kobayashi, T. Takeda, H. Uzawa, K. Kobayashi, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2053–2062.
- [99] Y. Miura, Y. Sasao, H. Dohi, Y. Nishida, K. Kobayashi, *Anal. Biochem.* **2002**, *310*, 27–35.
- [100] M. A. Karmali, *J. Infect. Dis.* **2004**, *189*, 355–359.
- [101] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669–672.
- [102] M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Carbohydr. Res.* **1998**, *310*, 35–41.
- [103] G. L. Mulvey, P. Marcato, P. I. Kitov, J. Sadowska, D. R. Bundle, G. D. Armstrong, *J. Infect. Dis.* **2003**, *187*, 640–649.
- [104] K. Nishikawa, K. Matsuoka, E. Kita, N. Okabe, M. Mizuguchi, K. Hino, S. Miyazawa, C. Yamasaki, J. Aoki, S. Takashima, Y. Yamakawa, M. Nishijima, D. Terunuma, H. Kuzuhara, Y. Natori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7669–7674.
- [105] K. Nishikawa, K. Matsuoka, M. Watanabe, K. Igai, K. Hino, K. Hatano, A. Yamada, N. Abe, D. Terunuma, H. Kuzuhara, Y. Natori, *J. Infect. Dis.* **2005**, *191*, 2097–2105.
- [106] H. Isobe, K. Cho, N. Solin, D. B. Werz, P. H. Seeberger, E. Nakamura, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4611–4614.
- [107] a) Y. Y. Chien, M. D. Jan, A. K. Adak, H. C. Tzeng, Y. P. Lin, Y. J. Chen, K. T. Wang, C. T. Chen, C. C. Chen, C. C. Lin, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1100–1109; b) H. Uzawa, H. Ito, P. Neri, H. Mori, Y. Nishida, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2117–2124.
- [108] a) J. P. Thompson, C. L. Schengrund, *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 837–845; b) A. V. Pukin, H. M. Branderhorst, C. Sisu, C. A. Weijers, M. Gilbert, R. M. Liskamp, G. M. Visser, H. Zuilhof, R. J. Pieters, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1500–1503; c) C. Sisu, A. J. Baron, H. M. Branderhorst, S. D. Connell, C. A. Weijers, R. de Vries, E. D. Hayes, A. V. Pukin, M. Gilbert, R. J. Pieters, H. Zuilhof, G. M. Visser, W. B. Turnbull, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 329–337.
- [109] D. Arosio, I. Vrasidas, P. Valentini, R. M. Liskamp, R. J. Pieters, A. Bernardi, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2113–2124.
- [110] E. K. Fan, Z. S. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663–2664.
- [111] H. M. Branderhorst, R. M. Liskamp, G. M. Visser, R. J. Pieters, *Chem. Commun.* **2007**, 5043–5045.
- [112] N. Parera Pera, H. M. Branderhorst, R. Kooij, C. Maierhofer, M. van der Kaaden, R. M. Liskamp, V. Wittmann, R. Ruijtenbeek, R. J. Pieters, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1896–1904.
- [113] W. E. Minke, C. Roach, W. G. Hol, C. L. Verlinde, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5684–5692.
- [114] E. A. Merritt, Z. Zhang, J. C. Pickens, M. Ahn, W. G. Hol, E. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8818–8824.
- [115] J. C. Pickens, D. D. Mitchell, J. Liu, X. Tan, Z. Zhang, C. L. Verlinde, W. G. Hol, E. Fan, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1205–1215.
- [116] H. A. Tran, P. I. Kitov, E. Paszkiewicz, J. M. Sadowska, D. R. Bundle, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3658–3671.
- [117] S. Liu, K. L. Kiick, *Macromolecules* **2008**, *41*, 764–772.
- [118] R. Maheshwari, E. A. Levenson, K. L. Kiick, *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 68–81.
- [119] T. Kimura, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41576–41579.
- [120] G. D. Armstrong, G. L. Mulvey, P. Marcato, T. P. Griener, M. C. Kahan, G. A. Tennent, C. A. Sabin, H. Chart, M. B. Pepys, *J. Infect. Dis.* **2006**, *193*, 1120–1124.
- [121] M. B. Pepys, J. Herbert, W. L. Hutchinson, G. A. Tennent, H. J. Lachmann, J. R. Gallimore, L. B. Lovat, T. Bartfai, A. Alanine, C. Hertel, T. Hoffmann, R. Jakob-Roetne, R. D. Norcross, J. A.

- Kemp, K. Yamamura, M. Suzuki, G. W. Taylor, S. Murray, D. Thompson, A. Purvis, S. Kolstoe, S. P. Wood, P. N. Hawkins, *Nature* **2002**, 417, 254–259.
- [122] J. Y. Liu, Z. S. Zhang, X. J. Tan, W. G. J. Hol, C. L. M. J. Verlinde, E. K. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2044–2045.
- [123] D. Solomon, P. I. Kitov, E. Paszkiewicz, G. A. Grant, J. M. Sadowska, D. R. Bundle, *Org. Lett.* **2005**, 7, 4369–4372.
- [124] P. I. Kitov, T. Lipinski, E. Paszkiewicz, D. Solomon, J. M. Sadowska, G. A. Grant, G. L. Mulvey, E. N. Kitova, J. S. Klassen, G. D. Armstrong, D. R. Bundle, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 684–688; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 672–676.
- [125] P. I. Kitov, G. L. Mulvey, T. P. Griener, T. Lipinski, D. Solomon, E. Paszkiewicz, J. M. Jacobson, J. M. Sadowska, M. Suzuki, K. i. Yamamura, G. D. Armstrong, D. R. Bundle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 16837–16842.
- [126] T. P. Griener, J. G. Strecker, R. M. Humphries, G. L. Mulvey, C. Fuentealba, R. E. W. Hancock, G. D. Armstrong, *PLoS ONE* **2011**, 6, e21457.
- [127] K. Nishikawa, M. Watanabe, E. Kita, K. Igai, K. Omata, M. B. Yaffe, Y. Natori, *FASEB J.* **2006**, 20, 2597–2599.
- [128] M. Watanabe-Takahashi, T. Sato, T. Dohi, N. Noguchi, F. Kano, M. Murata, T. Hamabata, Y. Natori, K. Nishikawa, *Infect. Immun.* **2010**, 78, 177–183.
- [129] D. J. Stearns-Kurosawa, V. Collins, S. Freeman, D. Debord, K. Nishikawa, S. Y. Oh, C. S. Leibowitz, S. Kurosawa, *Pediatr. Nephrol.* **2011**, 26, 2031–2039.
- [130] M. Mourez, R. S. Kane, J. Mogridge, S. Metallo, P. Deschatelets, B. R. Sellman, G. M. Whitesides, R. J. Collier, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 958–961.
- [131] S. Basha, P. Rai, V. Poon, A. Saraph, K. Gujraty, M. Go, S. Sadacharan, M. Frost, J. Mogridge, R. S. Kane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 13509–13513.
- [132] K. Sandvig, B. van Deurs, *Gene Ther.* **2005**, 12, 865–872.
- [133] B. Stechmann, S.-K. Bai, E. Gobbo, R. Lopez, G. Merer, S. Pinchard, L. Panigai, D. Tenza, G. Raposo, B. Beaumelle, *Cell* **2010**, 141, 231–242.
- [134] A. M. Sanchez, D. Thomas, E. J. Gillespie, R. Damoiseaux, J. Rogers, J. P. Saxe, J. Huang, M. Manchester, K. A. Bradley, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51, 2403–2411.
- [135] R. J. Collier, *Mol. Aspects Med.* **2009**, 30, 413–422.
- [136] a) V. A. Karginov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 15075–15080; b) V. A. Karginov, E. M. Nestorovich, A. Yohannes, T. M. Robinson, N. E. Fahmi, F. Schmidtmann, S. M. Hecht, S. M. Bezrukov, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 3740–3753; c) M. Moayeri, T. M. Robinson, S. H. Leppla, V. A. Karginov, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 2239–2241.
- [137] A. Joshi, S. Kate, V. Poon, D. Mondal, M. B. Boggara, A. Saraph, J. T. Martin, R. McAlpine, R. Day, A. E. Garcia, J. Mogridge, R. S. Kane, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 791–796.
- [138] N. Seidah, G. Mayer, A. Zaid, E. Rousselet, N. Nassoury, S. Poirier, R. Essalmani, A. Prat, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, 40, 1111–1125.
- [139] T. Komiyama, J. M. Coppola, M. J. Larsen, M. E. van Dort, B. D. Ross, R. Day, A. Rehemtulla, R. S. Fuller, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 15729–15738.
- [140] G. Thomas, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 753–766.
- [141] a) M. Fugère, R. Day, *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, 26, 294–301; b) M. Chrétien, N. G. Seidah, A. Basak, M. Mbikay, *Expert Opin. Ther. Targets* **2008**, 12, 1289–1300; c) A. Basak, *J. Mol. Med.* **2005**, 83, 844–855.
- [142] S. Henrich, A. Cameron, G. P. Bourenkov, R. Kiefersauer, R. Huber, I. Lindberg, W. Bode, M. E. Than, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 520–526.
- [143] G. L. Becker, F. Sielaff, M. E. Than, I. Lindberg, S. Routhier, R. Day, Y. Lu, W. Garten, T. Steinmetzer, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 1067–1075.
- [144] a) S. A. Shiryayev, A. G. Remacle, B. I. Ratnikov, N. A. Nelson, A. Y. Savinov, G. Wei, M. Bottini, M. F. Rega, A. Parent, R. Desjardins, M. Fugere, R. Day, M. Sabet, M. Pellicchia, R. C. Liddington, J. W. Smith, T. Mustelin, D. G. Guiney, M. Lebl, A. Y. Strongin, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 20847–20853; b) A. G. Remacle, K. Gawlik, V. S. Golubkov, G. W. Cadwell, R. C. Liddington, P. Cieplak, S. Z. Millis, R. Desjardins, S. Routhier, X. W. Yuan, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, 42, 987–995.
- [145] A. Shen, P. J. Lupardus, V. E. Albrow, A. Guzzetta, J. C. Powers, K. C. Garcia, M. Bogoy, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 469–478.
- [146] A. W. Puri, P. J. Lupardus, E. Deu, V. E. Albrow, K. C. Garcia, M. Bogoy, A. Shen, *Chem. Biol.* **2010**, 17, 1201–1211.
- [147] T. C. Savidge, P. Urvil, N. Oezguen, K. Ali, A. Choudhury, V. Acharya, I. Pinchuk, A. G. Torres, R. D. English, J. E. Wiktorowicz, M. Loeffelholz, R. Kumar, L. Shi, W. Nie, W. Braun, B. Herman, A. Hausladen, H. Feng, J. S. Stamler, C. Pothoulakis, *Nat. Med.* **2011**, 17, 1136–1141.
- [148] a) N. Ahuja, P. Kumar, R. Bhatnagar, *Crit. Rev. Microbiol.* **2004**, 30, 187–196; b) D. T. Gallagher, N. N. Smith, S.-K. Kim, A. Heroux, H. Robinson, P. T. Reddy, *J. Mol. Biol.* **2006**, 362, 114–122.
- [149] R. K. Sunahara, C. W. Dessauer, A. G. Gilman, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, 36, 461–480.
- [150] R. J. Collier, J. A. T. Young, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2003**, 19, 45–70.
- [151] a) Y. Shen, Y. S. Lee, S. Soelaiman, P. Bergson, D. Lu, A. Chen, K. Beckingham, Z. Grabarek, M. Mrksich, W. J. Tang, *EMBO J.* **2002**, 21, 6721–6732; b) Q. Guo, Y. Shen, Y. S. Lee, C. S. Gibbs, M. Mrksich, W. J. Tang, *EMBO J.* **2005**, 24, 3190–3201; c) W.-J. Tang, Q. Guo, *Mol. Aspects Med.* **2009**, 30, 423–430.
- [152] a) D. Chen, M. Misra, L. Sower, J. W. Peterson, G. E. Kellogg, C. H. Schein, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 7225–7233; b) E. Laine, C. Goncalves, J. C. Karst, A. Lesnard, S. Rault, W.-J. Tang, T. E. Malliavin, D. Ladant, A. Blondel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 11277–11282.
- [153] S. Soelaiman, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 25990–25997.
- [154] M. Gottle, S. Dove, P. Steindel, Y. Shen, W. J. Tang, J. Geduhn, B. König, R. Seifert, *Mol. Pharmacol.* **2007**, 72, 526–535.
- [155] J. Geduhn, S. Dove, Y. Shen, W. J. Tang, B. König, R. Seifert, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, 336, 104–115.
- [156] J. C. Burnett, E. A. Henchal, A. L. Schmaljohn, S. Bavari, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, 4, 281–296.
- [157] a) V. Masignani, M. Pizza, R. Rappuoli in *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 3. Aufl. (Hrsg.: E. A. Joseph, R. P. Michel), Academic Press, London, **2006**, S. 213–244; b) K. P. Holbourn, C. C. Shone, K. R. Acharya, *FEBS J.* **2006**, 273, 4579–4593.
- [158] D. Corda, M. Di Girolamo, *EMBO J.* **2003**, 22, 1953–1958.
- [159] M. O. Hottiger, P. O. Hassa, B. Lüscher, H. Schüler, F. Koch-Nolte, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, 35, 208–219.
- [160] R. Jørgensen, A. E. Purdy, R. J. Fieldhouse, M. S. Kimber, D. H. Bartlett, A. R. Merrill, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 10671–10678.
- [161] M. Yamaizumi, E. Mekada, T. Uchida, Y. Okada, *Cell* **1978**, 15, 245–250.
- [162] S. P. Yates, P. L. Taylor, R. Jørgensen, D. Ferraris, J. Zhang, G. R. Andersen, A. R. Merrill, *Biochem. J.* **2005**, 385, 667–675.
- [163] Z. Turgeon, R. Jørgensen, D. Visschedyk, P. R. Edwards, S. Legree, C. McGregor, R. J. Fieldhouse, D. Mangroo, M. Schapira, A. R. Merrill, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55, 983–991.
- [164] G. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 3724–3727.
- [165] Y.-M. Lee, C. S. Babu, Y. C. Chen, M. Milcic, Y. Qu, C. Lim, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4038–4049.

- [166] B. Maurer, U. Mathias, P. Papatheodorou, S. Shekfeh, J. Orth, T. Jank, C. Schwan, W. Sippl, K. Aktories, M. Jung, *Mol. Biosyst.* **2011**, 7, 799–808.
- [167] a) C. C. Hase, R. A. Finkelstein, *Microbiol. Rev.* **1993**, 57, 823–837; b) S. Miyoshi, S. Shinoda, *Microbes Infect.* **2000**, 2, 91–98; c) J. Holton, *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2008**, 10, 99–104.
- [168] G. G. Schiavo, F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, P. P. de Laureto, B. R. DasGupta, C. Montecucco, *Nature* **1992**, 359, 832–835.
- [169] F. Brossier, M. Weber-Levy, M. Mock, J. C. Sirard, *Infect. Immun.* **2000**, 68, 1781–1786.
- [170] a) B. E. Turk, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, 9, 24–33; b) V. Roxas-Duncan, I. Enyedy, V. A. Montgomery, V. S. Eccard, M. A. Carrington, H. Lai, N. Gul, D. C. H. Yang, L. A. Smith, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 3478–3486.
- [171] B. Li, R. Pai, S. C. Cardinale, M. M. Butler, N. P. Peet, D. T. Moir, S. Bavari, T. L. Bowlin, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2264–2276.
- [172] a) K. Turton, J. A. Chaddock, K. R. Acharya, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 552–558; b) D. B. Lacy, W. Tepp, A. C. Cohen, B. R. DasGupta, R. C. Stevens, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 898–902.
- [173] a) M. Montal, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 591–617; b) P. G. Foran, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 1363–1371; c) B. Poulain, B. G. Stiles, M. R. Popoff, J. Molgo in *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 3. Aufl. (Hrsg.: E. A. Joseph, R. P. Michel), Academic Press, London, **2006**, S. 348–389.
- [174] Y. Xiong, J. Wiltsie, A. Woods, J. Guo, J. V. Pivnichny, W. Tang, A. Bansal, R. T. Cummings, B. R. Cunningham, A. M. Friedlander, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 964–968.
- [175] a) G.-S. Jiao, S. Kim, M. Moayeri, L. Cregar-Hernandez, L. McKasson, S. A. Margosiak, S. H. Leppla, A. T. Johnson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 6850–6853; b) S. Kim, G.-S. Jiao, M. Moayeri, D. Crown, L. Cregar-Hernandez, L. McKasson, S. A. Margosiak, S. H. Leppla, A. T. Johnson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 2030–2033.
- [176] a) J. Tang, J. G. Park, C. B. Millard, J. J. Schmidt, Y. P. Pang, *PLoS ONE* **2007**, 2, e761; b) Y. P. Pang, J. Davis, S. Wang, J. G. Park, M. P. Nambiar, J. J. Schmidt, C. B. Millard, *PLoS ONE* **2010**, 5, e10129.
- [177] a) S. L. Johnson, L.-H. Chen, R. Harbach, M. Sabet, A. Savinov, N. J. H. Cotton, A. Strongin, D. Guiney, M. Pellecchia, *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, 71, 131–139; b) M. Forino, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 9499–9504.
- [178] a) J. B. Baell, G. A. Holloway, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2719–2740; b) E. E. Carlson, J. F. May, L. L. Kiessling, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 825–837; c) M. E. Voss, P. H. Carter, A. J. Tebben, P. A. Scherle, G. D. Brown, L. A. Thompson, M. Xu, Y. C. Lo, G. Yang, R.-Q. Liu, P. Strzemienski, J. G. Everlof, J. M. Trzaskos, C. P. Decicco, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 533–538.
- [179] a) J. E. Zuniga, J. T. Hammill, O. Drory, J. E. Nuss, J. C. Burnett, R. Gussio, P. Wipf, S. Bavari, A. T. Brunger, A. L. Andreu, *PLoS ONE* **2010**, 5, e11378; b) J. E. Zuniga, J. J. Schmidt, T. Fenn, J. C. Burnett, D. Araç, R. Gussio, R. G. Stafford, S. S. Badie, S. Bavari, A. T. Brunger, *Structure* **2008**, 16, 1588–1597.
- [180] J. C. Burnett, C. Wang, J. E. Nuss, T. L. Nguyen, A. R. Hermone, J. J. Schmidt, R. Gussio, P. Wipf, S. Bavari, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 5811–5813.
- [181] M. Hale, G. Oyler, S. Swaminathan, S. A. Ahmed, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 1802–1811.
- [182] K. Sandvig in *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 3. Aufl. (Hrsg.: E. A. Joseph, R. P. Michel), Academic Press, London, **2006**, S. 310–322.
- [183] A. F. Monzingo, J. D. Robertus, *J. Mol. Biol.* **1992**, 227, 1136–1145.
- [184] Y. Endo, K. Tsurugi, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 8735–8739.
- [185] Y. Bai, B. Watt, P. G. Wahome, N. J. Mantis, J. D. Robertus, *Toxicon* **2010**, 56, 526–534.
- [186] P. G. Wahome, Y. Bai, L. M. Neal, J. D. Robertus, N. J. Mantis, *Toxicon* **2010**, 56, 313–323.
- [187] D. J. Miller, K. Ravikumar, H. Shen, J. K. Suh, S. M. Kerwin, J. D. Robertus, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 90–98.
- [188] Y.-P. Pang, J. G. Park, S. Wang, A. Vummenthala, R. K. Mishra, J. E. McLaughlin, R. Di, J. N. Kahn, N. E. Tumer, L. Janosi, J. Davis, C. B. Millard, *PLoS ONE* **2011**, 6, e17883.
- [189] S. J. Abdeen, R. J. Swett, A. L. Feig, *ACS Chem. Biol.* **2010**, 5, 1097–1103.